

**Aus dem Institut für Humangenetik
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin**

DISSERTATION

Pilotstudie

**zur Ätiologie der Trisomie 21 im Oman
mit molekulargenetischem Schwerpunkt**

**Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)**

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

**von
Jenny Nätke
aus Belzig**

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. H. Neitzel**
- 2. Prof. Dr. R. Rossi**
- 3. Prof. Dr. U. Eichenlaub-Ritter**

Datum der Promotion: 23.10.2006

Datum der Verleihung: 15.12.2006

Für Alexander

Abstract

Down syndrome (DS) is a main cause of human prenatal and postnatal morbidity and mortality, and a leading cause of birth defects and mental retardation. Most cases result from meiotic nondisjunction, particularly during oogenesis. There is increasing evidence that maternal meiosis is an error prone process that is most sensitive to the effect of exogenous factors at the time of chromosomal segregation, which is around conception. In addition to environmental factors, various genetic factors have been described which seem to influence the nondisjunction rate during meiosis. The first data of DS in the Oman yielded a high prevalence among live births. The birth prevalence of Trisomy 21 in Oman with 1:454 newborns is, perhaps, the highest reported so far.

We have performed a case control study based on a structured questionnaire. It covers socio demographics, family history of the woman and her partner, and work place history so that all suspected confounders and risk factors are covered. We identified increased maternal age as one factor for the birth of a DS child. The mean age of the mothers at the time of birth was 34, that of the fathers 41 years. The Down Syndrome child was born in average as the 8.5th among the siblings. The sex ratio among Down Syndrome children showed a predominance of boys as reported from other studies. The 242 Down Syndrome children of the total study had a ratio of 1.37:1 (m:f) compared to 1.09:1 (m:f) in their healthy siblings.

The main aim of the thesis was to investigate the parental origin of the extra chromosome 21, the number and chromosomal distribution of recombination events. In addition the MTHFR-polymorphism has been analyzed. We found that 51% cases were due to maternal meiosis I and 14% maternal meiosis II non-disjunction events. Further 19% originated also from maternal non-disjunction but the meiosis was uninformative. In two cases the non-disjunction could have occurred in either mitosis or meiosis II. Another 14% cases were not informative with the STR-markers used. Of the 72 informative cases, 80% were consistent with meiosis I (MI) nondisjunction and 20% with a meiosis II (MII) error during oogenesis. Surprisingly, there were no cases of paternal non-disjunction. These findings differ significantly from other publications where at least 8% were of paternal origin. There is no explanation for this phenomenon at present.

Analogous to Lamb et al. we analyzed the association between maternal age and meiotic recombination events and revealed similar results. The chromosomal distribution of crossing-over events differed between younger and older women. In younger women there was a higher crossing over rate in the telomeric regions while in older women the distribution of crossing-over events is similar to that of the control group.

Furthermore, we investigated the MTHFR-polymorphism among 83 families. The maternal constellation CT res. TT has been discussed with a higher maternal risk for having a child with Down Syndrome. In the Oman, the C-allele is more frequent (87%) than in other publications. The analysis of the segregation showed that preferentially the C-allele rather than the T-allele is transmitted to the Down Syndrome child. The results indicate, this polymorphism emerges in a large geographical variety and underlies perhaps special selection on the Arabic Peninsula.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	- 8 -
1.1 HISTORISCHER HINTERGRUND ZU DEM DOWN SYNDROM	- 10 -
1.2 FORMEN DER TRISOMIE 21.....	- 10 -
1.3 DIAGNOSTIK DES DOWN SYNDROMS UND KLINISCHE ZEICHEN	- 11 -
1.4 STAND DER FORSCHUNG	- 12 -
1.1.1 Fehlverteilungen der Chromosomen	- 13 -
1.1.2 Crossing-over Häufigkeiten	- 13 -
1.1.3 Geschlechterverhältnis in der freien Trisomie 21	- 14 -
1.1.4 Risikofaktoren.....	- 15 -
1.1.5 Methylentetrahydrofolat-Reduktase-Polymorphismus.....	- 16 -
1.1.6 Umweltfaktoren	- 18 -
1.5 VORARBEITEN DES INSTITUTS FÜR HUMANGENETIK.....	- 20 -
1.6 ZIEL UND VORGEHENSWEISE DER STUDIE	- 22 -
1.1.7 Begründung der eigenen Methoden.....	- 22 -
1.1.8 Warum eignet sich der Oman für diese Studie?.....	- 22 -
1.1.9 Struktur und Aufbau des Forschungsvorhabens	- 22 -
1.1.10 Beschreibung der Arbeitshypothese	- 23 -
MATERIAL UND METHODEN	- 25 -
2.1 FORSCHUNGSaufenthalt.....	- 25 -
2.2 STUDIENPOPULATION UND GEWINNUNG DER DNA.....	- 25 -
2.3 ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS MUNDschLEIMHAUTZELLEN	- 25 -
2.3.1. Geräte.....	- 25 -
2.3.2. Verfahren der DNA-Isolierung	- 26 -
2.4. POLYMERASE-KETTENREAKTION.....	- 26 -
2.4.1. Geräte.....	- 26 -
2.4.2. Amplifikationsreaktion.....	- 26 -
2.4.3. Verwendete Primer	- 28 -
2.5. QUALITATIVE DNA-ÜBERPRÜFUNG	- 30 -
2.5.1. Vorbereitung des Agarose-Gels	- 30 -
2.5.2. Gelelektrophorese	- 30 -
2.6. ANALYSE DER FRAGMENTE.....	- 31 -
2.6.1. Reagenzien.....	- 31 -
2.6.2. Denaturierung	- 31 -
2.6.3. Kapillar-Elektrophorese	- 31 -
2.6.4. Rohdatenverarbeitung	- 32 -
2.6.5. Auswertung am Beispiel	- 33 -
2.7. METHYLENTETRAHYDROFOLAT-REDUKTASE POLYMORPHISMUS	- 34 -

2.7.1.	Personenauswahl	- 34 -
2.7.2.	Geräte und Reagenzien	- 34 -
2.7.3.	Prinzip der Reaktion	- 34 -
2.8.	INTERVIEW	- 36 -
2.8.1.	Vorbemerkungen	- 36 -
2.8.2.	Datenbank	- 36 -
ERGEBNISSE		- 39 -
3.1.	AUSWERTUNG DER FRAGEBÖGEN	- 39 -
3.1.1.	Parentale Altersverteilung zum Zeitpunkt der Geburt des Kindes mit Trisomie 21	- 39 -
3.1.2.	Elterliche Geographische Herkunft und Konsanguinität	- 40 -
3.1.3.	Geschlechterverhältnis der Down Syndrom Kinder im Vergleich mit ihren gesunden Geschwistern- 41	
	-	
3.2.	MOLEKULARGENETISCHE ANALYSE DER NON-DISJUNCTION- UND CROSSING-OVER EREIGNISSE	- 42 -
3.3.	MTHFR-POLYMORPHISMUS	- 44 -
3.4.	ERGEBNISSE DER FAMILIE MIT 10 BETROFFENEN KINDERN	- 45 -
ERGEBNISANHANG ROHDATEN		- 50 -
DISKUSSION		59
5.1.	ELTERLICHES ALTER ZUM ZEITPUNKT DER GEBURT DES DOWN SYNDROM KINDES	59
5.2.	GESCHLECHTERVERHÄLTNISSE	59
5.3.	PARENTALER UND MEIOTISCHER URSPRUNG DES ZUSÄTZLICHEN CHROMOSOMS 21	60
5.4.	CROSSING-OVER-HÄUFIGKEITEN	61
5.5.	AUSWERTUNG DES MTHFR-POLYMORPHISMUS	63
5.6.	AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE DER SINGULÄREN KONSANGUINEN FAMILIE	64
5.7.	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	65
ZUSAMMENFASSUNG		67

EINLEITUNG

1.1 HISTORISCHER HINTERGRUND ZU DEM DOWN SYNDROM

1866 wurde das Down Syndrom von dem englischen Arzt John Langdon Down [Down 1866] als eigenständiges, von anderen Erkrankungen mit geistiger Behinderung abgrenzbares Krankheitsbild, geschildert. Er schrieb: „...Das Gesicht ist flach und breit, die Augen stehen schräg, und die Nase ist klein...“ Des Weiteren berichtete er von großen Lippen und großer Zunge, hypoelastischer Haut, der Anfälligkeit für pulmonale Erkrankungen und einer geringen Lebenserwartung. Er bescheinigte ihnen ein fröhliches Wesen, war aber dem Stand der Wissenschaft seiner Zeit entsprechend beeinflusst durch Darwins Evolutionstheorie. So meinte Langdon Down, dass das Syndrom die Rückverwandlung in einen primitiven Rassentyp darstellte und prägte wegen des etwas asiatischen Aussehens der Betroffenen, die Begriffe „mongoloide Idiotie“ und „Mongoloidismus“. Trotz ihrer fälschlichen und diskriminierenden Ursprünge fanden diese Begriffe lange Zeit Verwendung in der Medizin und wurden schließlich durch „Trisomie 21“ und „Down Syndrom“ ersetzt. Down erkannte den kongenitalen Charakter der Erkrankung, favorisierte aber irrtümlich die Tuberkulose als Ursache.

Der Verdacht auf eine Chromosomenaberration beim Down Syndrom wurde bereits 1932 von Waardenburg [Waardenburg 1932] geäußert, konnte aber erst 27 Jahre später bewiesen werden. Im Jahr 1959 erkannte der französische Genetiker Jérôme Lejeune [Lejeune et al. 1959 a], [Lejeune et al. 1959 b] anhand von Experimenten mit Fibroblastenkulturen, dass bei Kindern mit Down Syndrom in jeder Zelle 47 Chromosomen statt üblicherweise 46 vorhanden sind, weil das Chromosom 21 dreimal statt zweimal vorhanden ist. Hierbei handelte es sich um die erste Chromosomenaberration, die beim Menschen entdeckt worden war.

1.2 FORMEN DER TRISOMIE 21

Dem Krankheitsbild liegen numerische Chromosomenaberrationen der Autosomen vor, von denen folgende Formen existieren: In 95% der Fälle kommen freie Trisomien am häufigsten vor [Giraud und Mattei, 1975]. Bei einer Chromosomenzahl von 47 liegt das Chromosom 21 dreifach vor. Unter den Translokations-Trisomien 21, die mit etwa 4 % aller Trisomien 21 am zweithäufigsten sind, bilden die Robertson'schen Translokationen $t(14q21q)$ und $t(21q21q)$ die größte Gruppe [Mutton et al. 1996].

Diese können auf einer balancierten zentrischen Fusion bei einem klinisch unauffälligen Elternteil beruhen [Williams et al. 1975] oder auch spontan auftreten [Cantu et al. 1980]. Bei dem ersteren Fall handelt es sich um das Vorliegen zweier freier Chromosomen 21. Das dritte Chromosom 21 ist in Form einer zentrischen Fusion auf ein anderes akrozentrisches Chromosom transloziert, wobei die Chromosomenzahl 46 beträgt. Je nach Art der Translokation liegt das Wiederholungsrisiko bei 10-100% [Williams et al. 1975].

Mit einer 1%-igen Wahrscheinlichkeit treten Mosaiken und in Einzelfällen auch freie partielle Trisomien auf [Mutton et al. 1996], [Clarke et al. 1961]. Bei Trisomie 21 Mosaiken liegt neben einer Zelllinie mit normalem Chromosomenbefund noch eine Zelllinie mit Trisomie 21 vor. Bei diesen selteneren Formen der Trisomie 21 können klinische Symptome abgeschwächt sein [Park et al. 1987], [Williams et al. 1990], [Aula et al. 1973].

1.3 DIAGNOSTIK DES DOWN SYNDROMS UND KLINISCHE ZEICHEN

Nach der Geburt ist zunächst die klinische Diagnose vordergründig, welche bei Verdacht durch eine Chromosomenanalyse verifiziert werden kann. Hierfür hat Jackson [Jackson et al. 1976] einen diagnostischen Index mit 25 Symptomen erstellt (Tabelle1). Auf Grund der Variabilität des klinischen Bildes ist die Beurteilung nicht immer einfach. Jedes einzelne der vielen Symptome, welche das Down Syndrom ausmachen, kann für sich genommen auch bei Individuen mit normalem Chromosomensatz vorkommen. Außerdem treten alle Merkmale kaum in jedem Patienten zusammen auf. Der Epikanthus oder die Vierfingerfurche geben häufig den Anlass für eine Verdachtsdiagnose.

Tab. 1: Diagnostischer Index

Symptome des Down Syndroms nach Jackson et al. 1976:	
Brachizephalus	lateral ansteigende Lidachsen
Nystagmus	flache Nasenwurzel
schmaler Gaumen	Klinodaktylie V
muskulärer Hypotonus	Sandalenlücke
Einfaltung der Ohrmuschel	kurzer Hals
Epikanthus	Blepharitis, Konjunktivitis
Brushfield-Flecken	ständig offener Mund
Zahnveränderungen	herausragende Zunge
Lingua plicata	hoher Gaumen
Nackenfalte	Kurze, breite Hände
Brachydaktylie V	Vierfingerfurche
kongenitaler Herzfehler	Herzgeräusch
ligamentäre Hyperelastizität	

Andere Autoren erwähnen weitere Merkmale im Zusammenhang mit dem Down Syndrom, wie charakteristische Dermatoglyphen der Fingerbeeren [Rex and Preuss, 1995] und häufig auftretende Augenerkrankungen. Meist handelt es sich um Fehler der Lichtbrechung, Akkommodationsdefizite, Strabismus, Keratokonus und Katarakte [Haugen 2004].

Das Down Syndrom gilt als der verbreitetste prädisponierende Faktor für eine Reihe gastrointestinaler Fehlbildungen [Levy 1991]. Zu den häufigsten gehören Ösophago-tracheale Fisteln, duodenale Obstruktionen mit oder ohne Pylorusstenosen, Pankreas anulare, imperforierter Anus und Morbus Hirschsprung.



Abb. 1: Kind mit Down Syndrom

Nach Hitzler haben 10% der Neugeborenen mit Down Syndrom eine vorübergehende megakaryoblastische Leukämie. Obwohl die meisten leukämischen Zellen nach den ersten fünf Lebensmonaten spontan verschwinden, entwickeln 20 % der Betroffenen eine irreversible akute megakaryoblastische Leukämie innerhalb von vier Jahren [Hitzler 2005].

Die Häufigkeit kongenitaler Herzfehler (vorrangig AV-Kanal, Ventrikularseptumdefekt, Fallot Tetralogie) unter den Kindern ist hoch und variiert zwischen 40-50% der Fälle [Marino 1993]. Bis vor kurzem stellten sie noch den entscheidenden limitierenden Faktor in der Lebenserwartung dar, weil diese Herzfehler wegen des hohen Operationsrisikos früher nicht behandelt wurden.

Die Wahrscheinlichkeit an alzheimerischen neurodegenerativen Veränderungen zu erkranken, ist bei Down Syndrom Kindern erhöht und wird heute besonders durch die gestiegene Lebenserwartung vermehrt beobachtet [Brugge 1994].

1.4 STAND DER FORSCHUNG

Der Mensch ist das Lebewesen, bei dem Chromosomenaberrationen häufiger sein dürften, als bei jeder anderen Spezies. Mindestens 0,3% der Neugeborenen und schätzungsweise über 50 % aller Zygoten in Spontanaborten weisen einen aberranten Chromosomensatz auf [Hassold and Jacobs, 1984]. Bei den meisten Aberrationen handelt es sich um Aneuploidien, zu denen die Trisomie 21 gehört. Obwohl das Down Syndrom zu den häufigsten fetalen Todesursachen gehört und die häufigste genetische Ursache geistiger Behinderung beim Menschen ist, sind gesicherte ätiologische Kenntnisse vergleichsweise gering [Hassold 1999].

Erst durch den Einsatz hoch-polymorpher Marker, so genannter Mikrosatelliten, wurde es möglich, weitergehende Untersuchungen zur Ätiologie durchzuführen [Hassold 1999]. In der letzten Dekade wurden in zahlreichen Studien die Beziehung zwischen Rekombination und Non-disjunction untersucht, indem die Häufigkeit und Verteilung von Crossing-over Ereignissen, sowie die elterliche Herkunft von Allelen ermittelt wurden [Petersen and Mikkelsen, 2000], [Lamb et al. 1997]. Sie weisen darauf hin, dass die meisten autosomalen Trisomien, die Trisomie 21 eingeschlossen, auf ein meiotisches Non-disjunction zurückzuführen sind, welches sich vorwiegend in der Oogenese ereignet. Nur etwa 5% der Fälle mit Trisomie 21 gehen auf ein mitotisches Non-disjunction zurück [Hassold and Hunt, 2001].

1.4.1 FEHLVERTEILUNGEN DER CHROMOSOMEN

Bei der freien Trisomie sind Fehlverteilungen in der Meiose I und der Meiose II möglich. Bei der maternalen Fehlverteilung zeigt sich ein Verhältnis von Meiose I zu Meiose II von etwa 3:1 und bei der paternalen etwa ein 1:1 Verhältnis, geringfügig zugunsten der MII Fehler [Antanorakis et al. 1993], [Mikkelsen et al. 1995], [Yoon et al. 1996]. Die Non-disjunction in der Meiose I führt zu drei Chromosomen 21, von denen zwei unterschiedlich sind. Bei der Meiose II sind hingegen die beiden Chromosomen 21 im Zentromerbereich identisch, können aber über die Länge des Chromosoms Rekombinationsereignisse aufweisen. Beide maternalen Fehlverteilungen sind mit dem steigenden mütterlichen Alter korreliert [Antanorakis et al. 1993], [Mikkelsen et al. 1995], [Yoon et al. 1996]. Der Anteil der paternalen Non-disjunction-Ereignisse bei der Entstehung des Down Syndroms macht je nach Studie zwischen 8 % bis 20 % aus.

1.4.2 CROSSING-OVER HÄUFIGKEITEN

Der Einsatz von Mikrosatellitenmarkern ermöglicht es, veränderte Häufigkeiten und Orte meiotischer Rekombinationsereignisse zu untersuchen. Die Zahl der Crossing-over Ereignisse ist bei den meisten Trisomie 21 Fällen, die auf einem Fehler in der Meiose I beruhen, deutlich verringert. Bei der Meiose II wurde hingegen erhöhte Rekombinationen gefunden [Sherman et al. 1992]. In der ersten maternalen Reifeteilung sind speziell die zentromernahen Austauschereignisse seltener und in etwa 30% der Fälle wird überhaupt kein Crossing-over gefunden [Lamb et al. 1997], [Hassold 2000]. Im Gegensatz hierzu ist bei der Trisomie 21, die auf einen MII-Fehler zurückgeht, die proximale Austauschrate besonders hoch [Lamb et al. 1997]. Der Zusammenhang zwischen Rekombination und Chromosomenfehlverteilung ist damit offensichtlich, wobei die eigentlichen Gründe hierfür aber weiterhin unverstanden sind.

Die Assoziation zwischen mütterlichem Alter und meiotischer Rekombination wurde von [Lamb et al. 2005] neu untersucht. Die 400 Trisomie 21 Fälle, in denen eine Meiose I Fehlverteilung auftrat, wurden in drei mütterliche Altersgruppen aufgeteilt. Die Austauschhäufigkeiten pro Regionen unterschieden sich signifikant zwischen den Altersgruppen.

In der Gruppe der jüngsten Frauen fielen 34% der Austausche auf die perizentromeren und telomeren Regionen. In der Gruppe der ältesten Frauen betrafen diese pericentromer und telomernahen Austauschereignisse nur 10% und waren vergleichbar mit dem Austauschmuster der Kontrollgruppe (normally disjoining group).

Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass der größte Risikofaktor für eine Non-disjunction unter jungen Müttern die Anwesenheit eines empfindlichen Austauschmusters ist. Sie mutmaßen, während des Alterns der Frau, akkumulieren umwelt- und altersabhängige Beeinträchtigungen im Ovar, was zur Fehlverteilung der Oozyten mit stabilen Austauschmustern führt. Es ist dieses Risiko, beruhend auf rekombinations unabhängigen Faktoren, welches am meisten durch steigendes Alter beeinflusst sein könnte, und zu dem beobachteten maternalen Alterseffekt führt.

In dieser Dissertation sollen spezifische Rekombinationsmuster pro Altersgruppe untersucht werden. Bei der Untersuchung der Assoziation zwischen mütterlichem Alter und der Crossing-over Rate, orientiert sich die Vorgehensweise an der aktuellen Arbeit [Lamb et al. 2005].

1.4.3 GESCHLECHTERVERHÄLTNIS IN DER FREIEN TRISOMIE 21

Bereits 1951 beschrieb Hug ein Geschlechterverhältnis von 1,15:1 unter Down Syndrom Kindern zugunsten der Jungen [Hug 1951]. Dieser Überschuss des männlichen Geschlechts wurde seither vielfach bestätigt [Bernheim et al. 1979], [Nielsen et al. 1981], [Mikkelsen et al. 1990]. Da dieses Phänomen nur die freie Trisomie 21 und nicht die Translokations-Trisomie betrifft [Hassold et al. 1983], führte es zu der Vermutung, dass die Ursache im Zusammenhang mit der freien Trisomie steht und im eigentlichen nichts mit der Bevorzugung eines Geschlechtes zu tun hat.

Eine noch gravierendere Verschiebung des Geschlechterverhältnis (3,5:1) wurde unter den Trisomien 21 gefunden, die auf paternalen meiotischen Ursprung zurückgeführt werden konnten, im Gegensatz zu paternalen mitotischen oder maternalen Fehlern [Petersen et al.1993].

Eine Spermienuntersuchung unter gesunden Probanden ergab in Spermien, die disom für Chromosom 21 waren, einen deutlichen Überschuss an Y-tragenden Spermien (69 mit Y-Chromosom; 44 mit X-Chromosom) [Griffin et al.1996], was zu der Vermutung führte, dass das zusätzliche Chromosom 21 präferentiell mit dem Y-Chromosom segregiert [Petersen et al.1993]. Die genauen Ursachen dieses verschobenen Geschlechterverhältnisses sind aber noch immer unverstanden. Das Verhältnis von Jungen und Mädchen mit Trisomie 21 soll in der vorliegenden Studie ebenfalls ermittelt werden.

1.4.4 RISIKOFAKTOREN

Bezeichnend für die autosomalen Trisomien ist eine starke Abhängigkeit vom mütterlichen, jedoch nicht vom väterlichen Alter. Dieses Phänomen könnte direkt oder indirekt mit der langen Arretierung der Chromosomen im Dictyotän in Beziehung stehen, da bis zur Ovulation der entsprechenden Oozyte dieses Stadium Jahrzehnte dauern kann. Die tatsächliche Ursache dieser Altersabhängigkeit ist dagegen noch immer unverstanden, obwohl sie schon seit 50 Jahren bekannt ist.

Die Inzidenz der freien Trisomie 21 und auch anderer Trisomien zeigt übereinstimmend bei Frauen ab dem 35. Lebensjahr einen Anstieg der Aneuploidierate [Hassold 1996]. Das geringste Risiko, ein Kind mit Down Syndrom zu bekommen, haben junge Mütter um 25 Jahre in 2 pro 1000 Fällen [Hassold 1996]. Bis Anfang dieses Jahres, ging man davon aus, dass dieser Anstieg mit weiter steigendem mütterlichem Alter exponentiell verläuft, dies wurde jedoch durch [Morris et al. 2005] widerlegt. In dieser Meta-Analyse zeigte sich für 45-jährige Frauen, dass das Risiko, ein Kind mit Down Syndrom zu bekommen, bei 34 pro 1000 Geburten liegt, und sich nicht mit weiter steigendem Alter erhöht.

Neben dem wichtigsten Risikofaktor, des erhöhten mütterlichen Alters, gilt als weiterer die vorausgegangene Geburt eines Kindes mit einer Aneuploidie, besonders einer Trisomie 21. Das Wiederholungsrisiko liegt altersbereinigt deutlich höher als die Spontanrate bei etwa 1%. Ein Elternteil könnte Träger eines chromosomalen Keimbahnmosaiks sein, also eine Mischung aus normalen und trisomen Zellen besitzen und weitervererben [Bruyère et al. 2000], [Cozzi et al. 1999], [James et al. 1998], [Matsuura 2000].

Diese Erklärung greift aber nicht in den Fällen, bei denen die nachfolgende Aneuploidie eine Geschlechtschromosomenaberration betrifft. Eine mögliche Annahme ist, dass die genetische Ursache in einer Prädisposition für Non-disjunction der Autosomen liegt. Diskutiert werden Veränderungen in meiose-spezifischen Genen, die die Checkpoint Kontrolle beeinflussen könnten [LeMaire-Adkins et al. 1997].

Erste Anhaltspunkte für diese These gibt es beim Menschen. Eine Studie beschreibt zum Beispiel das gehäufte Auftreten von Trisomie 21 in Kuwait, in der die Bevölkerung eine hohe Anzahl an Verwandtenehen aufweist [Alfi et al. 1980].

Die Hypothese, dass genetisch bedingte Prädisposition zu erhöhten Non-disjunction-Raten bestehen könnte, wird durch die Beobachtung unterstützt, dass bei verschiedenen Eukaryonten (Hefe, Mais, Drosophila, Maus) Gene identifiziert wurden, deren Mutation zu erhöhten mitotischen und meiotischen Non-disjunction führt [Eichenlaub-Ritter 1998], [Koehler 1998], [Nasmyth 2002]. Beim Menschen wurden somatische Mutationen in den Genen MAD2 und BUB1 beschrieben, die in den betreffenden Zellen die Aneuploidierate erhöhen [Matsuura 2000], [Cahill 1998], sowie die nachstehenden Keimbahnmutationen gefunden, die das somatische Non-disjunction erhöhen:

- Apple-Peel intestinales Atresie und Microzephalie Syndrom (OMIM 243605)
- MVAS (mosaic variegated aneuploidy syndrome) (OMIM 257300)
- MVA mit vollständiger Chromatidtrennung (OMIM 176430)
- Roberts Syndrom (OMIM 268300)
- Rothmund-Thomson Syndrom: RECQ4-Defizienz (OMIM 268400)

1.4.5 METHYLENTETRAHYDROFOLAT-REDUKTASE-POLYMORPHISMUS

Kleine genetische Unterschiede in Form von Einzelnukleotidaustauschen im menschlichen Genom, genannt SNPs (single nucleotide polymorphism), sind zu wichtigen Werkzeugen bei der Erforschung molekularer Mechanismen unterschiedlichster biologischer Funktionen geworden. Bei der Aufklärung von Mechanismen, die zu komplexen genetischen Krankheiten führen, können SNPs als molekulare Marker helfen, beteiligte Gene zu finden.

Das Enzym Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) ist ein Zwischenprodukt des Methionin-Stoffwechsels, welcher die Umsetzung von Homocystein zu Methionin katalysiert. Ein erhöhter Homocysteinspiegel kann zum einen z.B. durch Vitamin B₆-, B₁₂- oder Folsäuremangel erworben sein, zum anderen kann er auch durch einen verbreiteten Polymorphismus im MTHFR-Gen bedingt sein. An der Position 677 findet sich bei der veränderten Form ein Basenaustausch von C (Cytosin) nach T (Thymin). Dieser Austausch resultiert in der Aminosäuresequenz des Proteins in einem Wechsel von Alanin zu Valin. Hierdurch entsteht ein thermolabiles Enzym mit verringerter Aktivität, wodurch weniger Homocystein zu Methionin remethyliert wird. Da bei dieser Sequenzvariante nur etwa 50% der Aktivität des Wildtyp-Enzyms bestehen, haben diese Individuen infolge dessen höhere Plasmawerte für Homocystein (Abbildung 2).

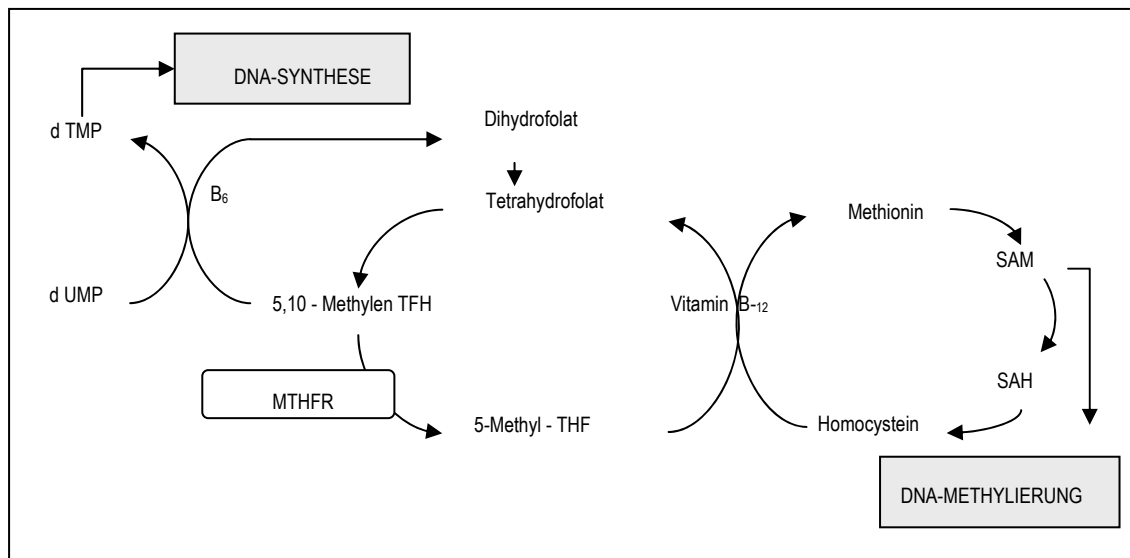


Abb. 2: Der C-T-Basenaustausch am Nucleotid 677 (677C-T) Mutation im Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) Gen reduziert die Aktivität von MTHFR und die Synthese von 5-Methyltetrahydrofolat (5-Methyl-THF), welches für die Remethylierung von Homocystein zu Methionin gebraucht wird. Aus der unvollständigen Synthese von 5-Methyl-THF und Methionin resultiert ein Fehlen von Methionin und S-Adenosylmethionin (SAM). Es kommt zu einer Akkumulation von Homocystein und S-Adenosylhomocystein (SAH). Eine Reduktion von SAM: SAH bewirkt eine geringere Effizienz der DNA (Cytosin-5)-Methyltransferase und ist mit der DNA Hypomethylierung assoziiert.
d TMP: Desoxythymidin Monophosphat; d UMP: Desoxyuridin Monophosphat

Der Polymorphismus ist weit verbreitet. Etwa 40% der europäischen Bevölkerung sind homozygot für den Wildtyp (C677), 45% heterozygot (C677 und T677) und 15% tragen homozygot die Sequenzvariante (T677) [Bowen et al. 1998]. Der homozygot veränderte Genotyp des MTHFR Gens stellt unter anderem einen Risikofaktor für Herzkranzgefäßerkrankungen und venöse Thrombosen dar [Haviv et al. 2002].

Da einige Autoren einen Zusammenhang dieses Polymorphismus' mit einem erhöhten maternalen Risiko für das Down Syndrom fanden [Hobbs et al. 2000], [James et al. 1999] wurde er auch in dieser Studie untersucht.

1.4.6 UMWELTFAKTOREN

In welchem Ausmaß die Non-disjunction-Rate beim Menschen auch durch exogene oder endogene Umweltfaktoren beeinflusst ist, bleibt umstritten. In unterschiedlichen Untersuchungsansätzen wurde die Häufigkeit der Trisomie 21 mit saisonalen endokrinologischen Veränderungen in Verbindung gebracht. Ebenso wurden Faktoren, die eine späte Befruchtung der ovulierten Eizelle fördern, in diesem Zusammenhang diskutiert, wie der seltenere Geschlechtsverkehr bei älteren Ehepaaren oder bei jungen, nicht verheirateten Mädchen in bestimmten religiösen Gruppen. Auch die Schilddrüse könnte direkt oder indirekt mit der Eireifung und der Chromosomensegregation in Beziehung stehen, weil das gehäufte Auftreten von Schilddrüsenautoantikörpern bzw. Schilddrüsenerkrankungen von Müttern mit Down Syndrom Kindern dafür spricht, wobei diese Korrelation nicht in allen Studien bestätigt wurde [Sperling 1998].

Eine Exposition gegenüber ionisierenden Strahlen, wie Röntgenstrahlen vor der Schwangerschaft, wurde als potentiell Risiko für Nachkommen mit Trisomie 21 sehr ausführlich erörtert. Denn in der Tat sind die positiven Befunde in dieser Hinsicht wesentlich zahlreicher als die negativen [Sperling et al. 1994b]. Das Kapitel 1.5 „Vorarbeiten des Instituts für Humangenetik“ geht detaillierter darauf ein. In zwei großen epidemiologischen Studien aus Gegenden erhöhter natürlicher Strahlenbelastung wurde übereinstimmend ein signifikant häufigeres Auftreten von Trisomie 21 gefunden. Die betroffenen Personen in Kerala (Südindien) [Kochupillai et al. 1976] und dem Yangjiang-Gebiet (China) [High Background Radiation Research Group, 1980] sind einer erhöhten natürlichen Strahlenbelastung durch thoriumhaltigen Monazitsand ausgesetzt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass schon sehr geringe Strahlendosen einen nachteiligen Effekt ausüben könnten.

In ähnlicher Weise wurde in Ungarn ein Zusammenhang zwischen der unbeabsichtigten Aufnahme von kontaminierten Fischen durch Trichlorphon, einer Chemikalie gegen Fischparasiten, zum Zeitpunkt der Konzeption und einer Häufung von Trisomie 21-Fällen demonstriert [Czeizel et al. 1993].

Tab. 2: Angenommene Risikofaktoren für meiotisches Non-disjunction beim Menschen

Erhöhtes mütterliches Alter	
	Begrenzter Vorrat an Oozyten
	Zwei Treffer Modell : Häufigkeit und Verteilung der Crossing-over
	Gestörter Ablauf der Reifeteilungen
	Defekt bei der Ausbildung der Spindel
	Defekt bei der Checkpoint Kontrolle
Genetisch bedingte Risikofaktoren	
	Defekt im Folatmetabolismus
	Vorliegen des Apolipoprotein ε 4 Allels
	Vorliegen des Polymorphismus im Presenilin-1 Gen
	Heterozygotie für das Bloom Syndrom
	Gestörte Funktion der Mitochondrien
	Konsanguinität der Eltern (Homozygotie für rezessives Gen)
Chromosomale Risikofaktoren	
	Größe der Chromosomen
	Vorhandensein doppelter NORs
	Veränderung in der Menge alphoider DNA
	Aberrante Struktur des Centromers
	Vorzeitige Trennung der Centromere
Peristatische Risikofaktoren	
	Strahlenexposition
	Einnahme oraler Kontrazeptiva
	Medikamente zur Verbesserung der Fertilität
	Vorliegen von Schilddrüsen Antikörpern
	Alkohol Missbrauch
	Nikotin Missbrauch
	Virusinfektionen zum Zeitpunkt der Konzeption
	Aufnahme von Metrifonat zum Zeitpunkt der Konzeption
Andere Faktoren	
	Häufigkeit des Geschlechtsverkehrs
	Saisonale Schwankungen endokrinologischer Faktoren

Aus der ungewöhnlich hohen Zahl von Zygoten mit Aneuploidien beim Menschen lässt sich folgern, dass die Meiose ein sehr fehleranfälliger Prozess ist, der daher vermutlich relativ leicht beeinflusst werden kann. Die Erforschung kausaler Zusammenhänge ist möglicherweise bisher wenig erfolgreich gewesen, weil es sich um ein multifaktorielles Geschehen handeln könnte.

Vermutlich müssen mehrere Faktoren zusammenwirken. Einerseits sind es die prädisponierenden Faktoren, die z.B. die Häufigkeit und Verteilung von Crossing-over Ereignissen oder anderer meiose-spezifischer Prozesse beeinflussen.

Zusätzlich könnten eventuell endogene oder exogene Einflüsse in einer bestimmten kritischen Phase, unmittelbar vor den beiden Reifeteilungen, einwirken. Nur epidemiologische Studien können über diesen Zusammenhang Aufschluss geben.

Bedeutsam hierbei ist, dass der Zeitpunkt der Fehlverteilung sehr präzise angegeben werden kann, da er direkt vor oder nach der Befruchtung liegt. Die vorangehende Tabelle 2 (erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit) gibt eine zusammenfassende Übersicht der Faktoren, die in Beziehung mit Non-disjunction beim Menschen diskutiert wurden.

1.5 VORARBEITEN DES INSTITUTS FÜR HUMANGENETIK

Bis zum Fall der Mauer 1989 war das Institut für Humangenetik allein für die genetische Beratung und zytogenetischen Diagnostik der West-Berliner Bevölkerung zuständig. Die wichtigsten publizierten Ergebnisse zur Trisomie 21 [Sperling et al 1992], [Sperling et al 1994a], [Sperling et al 1994b] sollen hier kurz zusammengefasst werden.

In der Zeit von 1980 bis 1989 wurden unter 190.073 Neugeborenen Berlins insgesamt 226 Fälle mit freier Trisomie 21 entdeckt und 101 im Rahmen der vorgeburtlichen Diagnostik. Berücksichtigt man, dass es zwischen dem Zeitraum der pränatalen Diagnostik und der Geburt bei etwa 30% der Feten zu einem Abort kommt, wären ohne die pränatale Diagnostik insgesamt 297 Fälle unter den Neugeborenen erwartet worden. Damit ergibt sich eine Prävalenz der Trisomie 21 in Berlin von 1 auf 640 Lebendgeborenen. Obwohl eine ständige Zunahme der vorgeburtlichen Diagnostik zu verzeichnen war, nahm die Häufigkeit der Trisomie 21 nicht ab, sondern eher zu. Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Die höchsten Werte wurden 1987 gefunden, und beruhen allein auf einem Häufigkeitsmaximum von 12 Fällen im Monat Januar (10 unter Neugeborenen, 2 nach vorgeburtlicher Diagnostik im 1. Trimenon). Eine Zeitreihenanalyse ergab, dass dieser Unterschied hoch signifikant ist. Ein derart distinkter zeitlicher Effekt lässt eine exogene Ursache vermuten. Genau 9 Monate zuvor war es zu der Reaktorkatastrophe in Tschernobyl gekommen und die ersten radioaktiven Wolken hatten Berlin überquert.

8 der 12 Fälle mit Trisomie 21 wurden während dieser kritischen Zeit gezeugt, sodass ein Zusammenhang zwischen der Strahlenbelastung und der Trisomie 21 nicht von vornherein ausgeschlossen werden konnte, da die Mehrzahl der Trisomie 21 Fälle auf eine Fehlverteilung bei der Eizellbildung zurückgeht, die unmittelbar vor der Konzeption erfolgt.

Durch eine unabhängige Stichprobe, der in der Bundesrepublik vorgeburtlich diagnostizierten Fälle, konnte eine Überprüfung der Resultate vorgenommen werden. Bei der Auswertung von etwa 30.000 zytogenetischen Untersuchungen ergaben sich für diesen Monat keine solch herausragenden Werte. Die wöchentliche Aufschlüsselung wies allerdings darauf hin, dass der höchste Wert trisomer Feten jene Fälle betraf, die in der am stärksten strahlenbelasteten Zeit und in dem am stärksten exponierten Gebiet gezeugt wurden. Dadurch konnte die in Berlin gemachte Beobachtung im Prinzip bestätigt werden [Sperling et al 1991].

Als mutmaßliche Erklärung für einen derart zeitlich begrenzten Strahleneffekt kommt die Inkorporation von aerosolgebundenem Jod-131 in Frage. Dieses stellte eines der häufigsten Radionuklide des „Tschernobyl-fall-outs“ dar. Jod-131 besitzt eine physikalische Halbwertszeit von nur 8 Tagen und eine biologische, die noch darunter liegt. Die Aufnahme von Jod-131 durch die Schilddrüse während der beiden kritischen Wochen in Berlin entsprach einer Strahlendosis von etwa 120 mrem, also der normalerweise pro Jahr anfallenden externen Strahlenbelastung.

Unter der Annahme eines kausalen Zusammenhangs ist die Schlussfolgerung daraus, dass die maternalen Reifeteilungen offensichtlich einen besonders störanfälligen Prozess darstellen und dass daher neben ionisierenden Strahlen sicher auch eine Reihe anderer Noxen einen Einfluss auf die Trisomie 21 Rate haben können. Dies wurde von ungarischen Genetikern für Trichlorfon, einer Chemikalie gegen Fischparasiten angenommen, wobei vom Berliner Institut für Humangenetik die molekularbiologischen Untersuchungen zur Abklärungen der elterlichen Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 21 durchgeführt wurden [Czeizel et al. 1993].

Für den Nachweis derartiger Noxen sind Fall-Kontroll-Studien geeignet, wobei der Erfassung von Expositionen zum Konzeptionstermin besondere Bedeutung zukommt. Wir haben in Berlin hierzu eine Machbarkeitsstudie durchgeführt, die auf der Befragung von 50 Müttern von Trisomie 21 Kindern und 272 Kontrollpersonen beruhte. Sie war so angelegt, dass die Absicherung der Odds Ratio von 2,5 bei einer Expositionsrate gegenüber dem Risikofaktor für die Kontrollen von 20-25% ($\alpha=0,05$, $\beta=0,2$) möglich ist [Pelz und Sperling 2002]. Der hierfür eingesetzte Fragebogen liegt auch der vorliegenden Studie zugrunde.

1.6 ZIEL UND VORGEHENSWEISE DER STUDIE

1.6.1 BEGRÜNDUNG DER EIGENEN METHODEN

Für die Ermittlung eines kausalen Zusammenhangs zwischen einer Exposition und der Entstehung eines bestimmten seltenen Ereignisses, wie der Geburt eines Kindes mit Trisomie 21, kommt unter den Gesichtspunkten der Effektivität und der Ökonomie nur eine Fall-Kontroll-Studie in Frage. Diese muss auf einer genügend großen Fallzahl basieren und klar definierte Expositionsgrößen und –zeitpunkte verwenden. Als Konsequenz aus unseren eigenen oben genannten Untersuchungen muss dabei besonderer Wert auf die Ermittlung einer potentiellen Exposition zum Zeitpunkt der Konzeption gelegt werden.

1.6.2 WARUM EIGNET SICH DER OMAN FÜR DIESE STUDIE?

Die omanische Population bietet in vielerlei Hinsicht günstige Voraussetzungen für genetische Fall-Kontroll-Studien. Die Familien sind sehr kinderreich, und auf Grund der guten Versorgungslage der letzten Jahrzehnte überleben auch viele von ihnen. Gleichzeitig handelt es sich um ein überwiegend moslemisches Land, in dem Verhütungsmethoden, Pränataldiagnostik und Schwangerschaftsabbrüche unüblich sind. Zudem bieten die weitgehend monogamen Ehen weniger Zweifel an den tatsächlichen Vaterschaftsverhältnissen, als zum Beispiel in Europa. Zudem war die Bereitschaft der Familien hoch, an dieser Studie teilzunehmen.

Mit Frau Dr. Anna Rajab, als der einzigen Person im Oman, die für die klinisch-genetische Diagnostik und die zytogenetische Diagnostik zuständig ist, bot sich eine Zusammenarbeit an. Zur Vorbereitung der Studie hat Dr. Rajab sämtliche Fälle mit Trisomie 21 zusammengestellt und den Kontakt zu den betreuenden Ärzten aufgenommen.

1.6.3 STRUKTUR UND AUFBAU DES FORSCHUNGSVORHABENS

Der 6-wöchige Forschungsaufenthalt von Prof. Dr. Neitzel und Herrn Abdelkrim Marnich wurde im Januar und Februar 2004 durchgeführt. Sie suchten in dieser Zeit die in Abbildung 2 verzeichneten Regionen mit betroffenen Familien auf. Die teilnehmenden Familien wurden über die Studienbedingungen aufgeklärt und die Fragebögen ausgefüllt. Die Interviews fanden auf Arabisch statt, die Antworten wurden aber auf Englisch zu Auswertungszwecken dokumentiert. Parallel wurden Mundschleimhautproben bzw. Blutproben von den Eltern und ihrem betroffenen Kind entnommen und mittels Kurier nach Berlin gesendet.

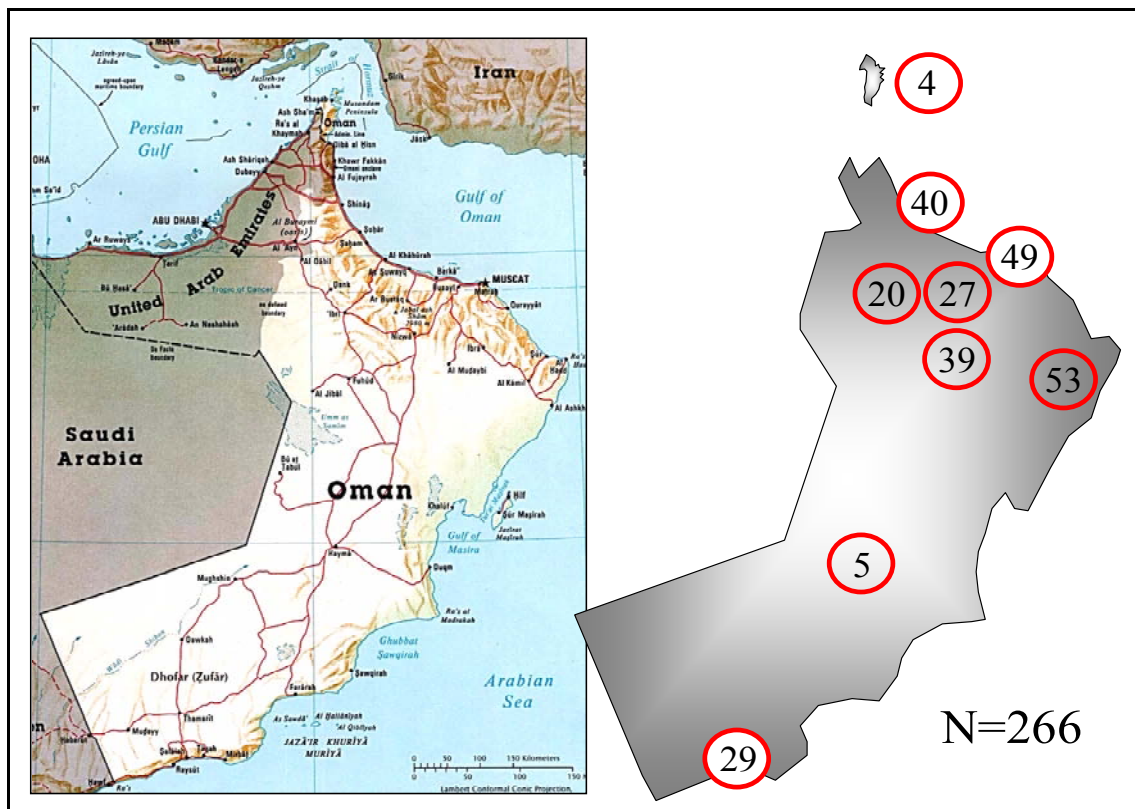


Abb. 3: Karte des Omans; rechts sind die Anzahl und Regionen der Familien, die aufgesucht wurden, verzeichnet.

Bei der Auswertung musste die Altersverteilung der Mütter im Oman ermittelt werden. Außerdem sollten aus dem Fragebogen weitere besondere biografische Einflüsse ausgewertet werden. Aus den Mundschleimhautproben sollte mit einem Satz von 22 Mikrosatelliten-Markern, die das Chromosom vollständig abdecken, die DNA extrahiert werden. Des Weiteren sollte die Zahl und Verteilung der Crossing-over Ereignisse ermittelt werden. Zudem sollte die elterliche Herkunft des überzähligen Chromosoms und Art der Non-disjunction aufgeklärt werden.

Für die Durchführung der Studie lag ein positives Ethikkommissionsvotum der Charité und des Ministry of Health aus dem Oman vor.

1.6.4 BESCHREIBUNG DER ARBEITSHYPOTHESE

Im Jahr 2001 konnte Dr. Rajab unter den 48.000 Neugeborenen des Omans (Omans Bevölkerung beträgt ca. 1,7 Mio. Einwohner) 67 Kinder mit einer Freien Trisomie 21 diagnostizieren. Nach ihren Angaben dürfte die Erfassungsrate bei etwa 80 bis 90% liegen. Die tatsächliche Zahl der Fälle mit dem Down Syndrom läge danach bei ca. 1:600 Neugeborenen. Im Oman weist die Trisomie 21 demnach eine ungewöhnlich hohe Prävalenz auf, besonders die große Anzahl familiärer Fälle mit freier Trisomie.

Die Frage stellt sich daher, ob es im Oman prädisponierende genetische Faktoren für die Trisomie 21 gibt und eventuell exogene Risikofaktoren. Nach dem (subjektiven) Eindruck von Frau Dr. Rajab hat in den letzten Jahren das Down Syndrom unter den Neugeborenen deutlich zugenommen. Im Hinblick auf die aktuelle Arbeit von [Lamb et al.2005], soll nach spezifischen Rekombinationsmustern gesucht werden, nachdem die Altersverteilung der Mütter ermittelt ist. Die innerfamiliäre Vererbung des MTHFR T-Allels der lebendgeborenen Down Syndrom Kinder und ihrer Eltern soll untersucht werden, um die These des Überlebensvorteils [Hobbs et al. 2002] zu bestätigen. Die DNA einer speziellen konsanguinen Familie wird mit Mikrosatelliten, die das ganze Chromosom 21 abdecken, molekulargenetisch untersucht. Bei allen anderen Familien wurden 6-7 Mikrosatelliten-Marker verwendet, die das Chromosom 21 über die Länge abdecken.

MATERIAL UND METHODEN

1.7 FORSCHUNGSaufenthalt

Grundlage des Forschungsvorhabens war ein 6-wöchiger Forschungsaufenthalt in Januar und Februar 2004 im Oman von Prof. Dr. Neitzel und Herrn Abdelkrim Marnich, einem arabisch sprechenden Mitarbeiter (Fotograf und Dokumentationsassistent) des Instituts für Humangenetik.

1.8 STUDIENPOPULATION UND GEWINNUNG DER DNA

Während des Forschungsaufenthalts suchten Prof. Dr. Neitzel und Herr Marnich 270 Familien, die sich in 15 Krankenhäusern aus 4 Regionen des Omans befanden, auf, von denen die Mundschleimhautproben entnommen und Fragebögen ausgefüllt wurden. Bei 117 Familien konnte die DNA betroffener Trisomie 21 Kinder und beider Eltern erfasst werden. Die Proben und Fragebögen dieser Familien bildeten die Basis für die vorliegende Dissertation. Den Personen wurde mehrere Male mit einem Watteträger über die Wangenschleimhaut gestrichen und die so gewonnenen Epithelzellen in 2 ml große Eppendorf-Gefäße (gefüllt mit 50 mM Tris: pH 8.0, 50 mM EDTA, 50 mM Sucrose, 100 mM NaCl, 10% SDS) gegeben. Außerdem wurde 10 Mitgliedern einer Familie mit mehreren Trisomie 21 Kindern Blut abgenommen und ihre Proben mittels Courier Dienst (DHL) nach Berlin gesendet.

1.9 ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS MUNDSCHLEIMHAUTZELLEN

1.9.1 GERÄTE

Tab. 3: Geräte zur Isolierung der DNA

Produktname	Herstellerfirma
Thermomixer	eppendorf
BioRobot® dM48	Qiagen

In Berlin angekommen, wurde aus den Proben die DNA nach folgendem Protokoll extrahiert: Die Gefäße wurden 15 min in Thermomixer bei 90°C erwärmt und bei 700 rpm gerüttelt, um die Zellen aus der Watte zu lösen. Anschließend wurde das Lysat in 1,5 ml Eppendorf Gefäße pipettiert und in den BioRobot® dM48 der Firma QIAGEN gestellt. Ferner wurde der BioRobot® dM48 mit dem in Tabelle 4 beschriebenen Reaktions-Kit, sowie mit weiteren speziellen Arbeitsplatten und Pipettierspitzen laut Herstellerangaben bestückt.

1.9.2 VERFAHREN DER DNA-ISOLIERUNG

Tab. 4: Fertiges Reaktionssystem (Kit) zur Isolierung genomischer DNA aus Mundschleimhautzellen

Produktname	Herstellerfirma	Menge
MagAttract DNA Blood Mini M 48 KIT:	QIAGEN	
MagAttract Suspension B		2x8ml
Puffer ML		3x54ml
Puffer MW1		2x77ml
Puffer MW2		1x87ml
RNase-freies Wasser		1x90ml

Das angeschlossene Computerprogramm zeigte die Extraktionsschritte und Geschwindigkeit an. Gleichzeitig können 48 verschiedene Proben isoliert werden. Der Hersteller QIAGEN gibt keine Angaben, welche Reagenzien im Reaktions-Kit enthalten sind, erläutert aber das Prinzip der DNA Extraktion: Magnetische Partikel binden an die DNA, die dann von einem äußeren Magneten gehalten werden. Das Lysat, bestehend aus Puffer, Salzen und eventuellen Watterückständen wird in mehreren Waschschritten entfernt. Nach Entfernung der magnetischen Partikel bleibt die gereinigte DNA in einer Konzentration von circa 5-10 ng in Ethanol präzipitiert übrig.

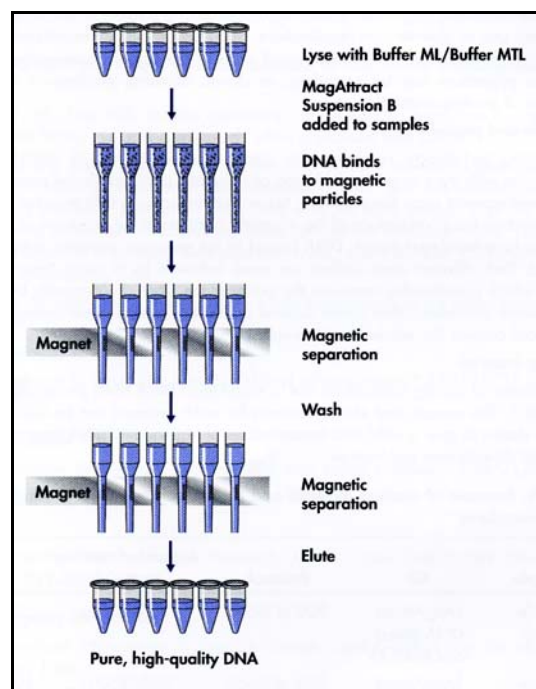


Abb. 4: DNA-Extraktion

1.10 POLYMERASE-KETTENREAKTION

1.10.1 GERÄTE

Tab. 5: Verwendete Geräte (sofern nicht gesondert unter dem Kapitel 3.5 angegeben)

Gerät	Bezeichnung (Herstellerfirma)
3100 Genetic Analyser	Applied Biosystems / Hitachi
PRC-Geräte	Gene Amp PCR System 2400 und 9600 (Perkin Elmer, Applied Biosystems)
Zentrifuge	Labofuge 400 R
Waage	Sartorius
Mikrowelle	Siemens

1.10.2 AMPLIFIKATIONSREAKTION

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion [Saiki et al.1988] wurde 1987 von Kary B. Mullis

entwickelt. Dieses Verfahren hat die genetischen Analysen revolutioniert, denn es ermöglicht, enzymatisch von bestimmten Nukleotidsequenzen in vitro millionenfache Kopien herzustellen. Dieser als Amplifikation bezeichnete Vorgang macht auch sehr geringe Ausgangsmengen einer Analyse schnell zugänglich. Die Vorgänge bei der Vervielfältigung einer Nukleinsäure mittels PCR ähneln dem Reaktionsablauf der natürlichen Replikation. Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase, ausgehend von Startermolekülen, einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäure-Matrize, der Template-DNA. Bei der PCR werden als Startermoleküle synthetische DNA-Oligonucleotide (Primer) verwendet, die spezifisch an die Template-DNA hybridisieren. Von deren 3'-Ende aus synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase den neuen DNA-Doppelstrang. Durch die Wahl des gegenläufig orientierten Oligonukleotid-Primerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Das entscheidende Prinzip ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wodurch die Matrize exponentiell amplifiziert wird.

Tab. 6: Ansatz für die PCR pro Tube

Name	Menge pro Ansatz	Konzentration	Hersteller
dH ₂ O	11µl		J.T.Baker
Puffer	1,5µl	10-fach	eppendorf
Primer Forward	1µl	10pmol	MWG-Blothech AG
Primer Reverse	1µl	10pmol	MWG-Blothech AG
dnTp's	0,15µl	10pmol	Rapidozym
Taq-Polymease	0,1µl	5U/ µl	FirePol® Solis Biodyne
DNA	1 µl	50ng	

Die PCR Amplifikation wurde in mehreren Ansätzen unter ansonsten gleichen Bedingungen durchgeführt. Der in Tabelle 6 beschriebene Ansatz unterschied sich lediglich in den Primerpaaren für die verschiedenen zu untersuchenden Marker. Ein PCR-Zyklus durchläuft zunächst die thermische Denaturierung. An die entstandene einzelsträngige DNA hybridisieren danach die Oligonukleotid-Primer (Annealing). Davon ausgehend synthetisiert die DNA-Polymerase schließlich die komplementären Stränge (Extension). Die PCR wurde auf ABI 9600 Cycler ausgeführt, der für bis zu 96 PCR-Probengefäße ausgerüstet ist. Eine automatische Steuerung regelt das zyklische Temperaturprogramm, in dem die jeweilige Temperatur und Zeit pro Reaktionsschritt sowie die Zyklenzahl wie in Tabelle 7 programmiert wurden.

Tab. 7: Reaktionsschritte des ABI 9600 Cyclers

Reaktionsschritte	Temperatur	Dauer	Zyklen
-------------------	------------	-------	--------

1	Initiale Denaturierung	94°C	5min	1x
2a)	Denaturierung	96°C	10sec	5x mit je minus 1°C beim Annealing
2b)	Annealing (touch down)	60°C bis 55°C	30sec	
2c)	Extension	72°C	30sec	
3a)	Denaturierung	96°C	10sec	25x
3b)	Annealing	55°C	30sec	
3c)	Extension	72°C	30sec	
4	Finale Extension	72°C	10min	1x
5	Kühlen	4°C	∞	

1.10.3 VERWENDETE PRIMER

Mikrosatelliten oder polymorphe Marker können unterschiedliche Anzahlen von kurzen, aneinander gelagerten Repeat-Einheiten enthalten. Führt man eine PCR mit Primern durch, die solche Repeats begrenzen, entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Marker, für die verschieden lange DNA-Fragmente (Allele) bekannt sind, werden als hoch polymorph bezeichnet. Auf jedem Chromosom ist ein solches Allel vorhanden, so dass auf Grund eines diploiden Chromosomensatzes zwei Allele pro Person und im Fall der Trisomie 21 drei Allele pro Person amplifiziert werden können. Diese Allele werden stabil vererbt, das heißt die Länge der Repeats ändert sich fast nie bei der Vererbung von einer Generation auf die nächste; wohl unterscheidet sie sich aber bei nicht verwandten Individuen. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Individuum heterozygot (Het %) für ein Merkmal ist, und weitere Charakteristika der verwendeten Primer werden in den folgenden beiden Tabellen 8 und 9 angegeben.

Tab. 8: Übersicht und Reihenfolge der verwendeten Primer des Chromosoms 14

Quellen: Human Genome Database (HDG), National Center for Biotechnology Information (NCBI) und das Marschfield Center

[illegible]

Tab. 9: Übersicht und Reihenfolge der verwendeten Primer des Chromosoms 21

Quellen: Human Genome Database (HDG), National Center for Biotechnology Information (NCBI) und das Marschfield Center

Name	Primer-Sequenz in 5'-3'-Richtung	Lokalisation			Polymorphismen		
		Marshfield (cM)	NCBI (Kbp)	Zyto- genetisch	HET (%)	Nucleotid Repeats	Fragment (bp)
D21S215 F	GCTGACGTGACAGTTGTGAG	Centromer	Centromer	21q11.11	67.9	di-	168-180
D21S215 R	TCTAAACAGTGTGTCTAGC						
D21S369 F	ATGGCCTTGGCTAAATGCTG	Centromer	13678	21q11.11	70.0	di-	173-201
D21S369 R	CTAAGCTGATATGGTAAGTACA						
D21S1432 F	CTTAGAGGGACAGAACTAATAGGC	2,99	16265	21q11.11	k.A.	tetra-	127-155
D21S1432 R	AGCCTATTGTGGGTTTGTGA						
D21S1899 F	ACTGCATTATTCACAATAGCGAAG	9,72	18989	21q11.2	86	di-	153-187
D21S1899 R	CATGCTACAGGTCATACACAGAG						
D21S1414 F	GGCACCCAGTAAAAAATTACT	9,72	19476	21q11.2	87.5	tetra-	291
D21S1414 R	CTGTCTGTCTGTCTGTCTATC						
D21S1437 F	ATGTACATGTGTCTGGGAAGG	13,05	20569	21q21.1	78.45	tetra-	119-143
D21S1437 R	TTCTCTACATTTTACTGCCAACA						
D21S1914 F	CATTGGGCCTTCTGTCAAAT	19,39	24544	21q21.2-3	86.23	di-	203-223
D21S1914 R	CTGAACCAGGGCATGT						
D21S1258 F	CGTTTCAATATAGACCAGATAAAGG	24,73	27741	21q22.11	73.34	di-	139-157
D21S1258 R	AGGTCAACTGCCAAAATCTAAG						
D21S1909 F	CTGTGATTGTGTTTTCCATTAGCA	28,48	31453	21q22.11-13	85,59	di-	232-250
D21S1909 R	TTCCACACTGAGTCAAGAGCAGG						
D21S1888 F	AGGCAGGAGAATCACTTGAA	31,26	31775	21q22.11-13	86.14	di-	262-287
D21S1888 R	AGAAAGACATTCCATCGCT			11-13			
D21S1898 F	GCAGGAACACTCAGTCTCTTCAG	31,26	33529	k.A.	64	di-	215-235
D21S1898 R	GCTCCATTAACATTTTAGGCACG						
D21S1910 F	TTCTCTGGAATAAACGTGG	31,26	33870	21q22.12	94	di-	194-266
D21S1910 R	CACGGCAAAGTAGTATTTAATG						
D21S1445 F	TTGTGAGAAGCAAACGTGG	31,26	34296	k.A.	k.A.	di-	266-312
D21S1445 R	ATAATAGATGGCAAACAAATAGTTG						
D21S1895 F	AGTCCTACTGATAACTGTGGGC	33,84	35271	21q22.11-13	82.01	di-	224-282
D21S1895 R	CTGTCTCATAAGAACCTACCTGG			11-13			
D21S1252 F	TCTGTCTTTGTCTCACTATCTG	35,45	36747	21q22.11-13	80.36	di-	231-251
D21S1252 R	GCAATGCTCTGTGGCT			11-13			
D21S167 F	TCCTTCCATGTACTCTGCA	38,65	37116	21q22.2	82.1	di-	156-160
D21S167 R	TGCCCTGAAGCACATGTGT						
D21S2055 F	AACAGAACCAATAGGCTATCTATC	40,49	40112	k.A	k.A	k.A.	117-193
D21S2055 R	TACAGTAAATCACTGGTAGGAGA						
D21S1411 F	AAAGCATTGGCCTCCATG	51,49	43054	k.A	93.3	tetra-	109
D21S1411 R	TTAATATGGACCTGCTAGAATTTGG						
D21S1890 F	GGTCTGACCACAGATTTC	52,50	43704	k.A	88.0	di-	143-173
D21S1890 R	AAAAACACTCTGAACGATTAAGG						
D21S1903 F	GCTTGCTGAACCTCACCTG	53,64	44997	k.A	83.5	di-	225-265
D21S1903 R	GCCTCCCAAAGTGCTC						
D21S1446 F	ATGTACGATACGTAATACTTGACAA	57,77	46894	21q22.3	k.A.	tetra-	209-223
D21S1446 R	GTCCCAAAGGACCTGCTC						

1.11 QUALITATIVE DNA-ÜBERPRÜFUNG

Tab. 10: Geräte für die Herstellung des Agarose-Gels und die Gelelektrophorese

Geräte	Bezeichnung (Herstellerfirma)	
Elektrophoresekammer	Horizon™ 11-14, Bethesda Research Laboratories	Life Technologies Inc.
Spannungsgerät	Electrophoresis Power Supply ST606T, Gibeco BRL	Life Technologies Inc.
UV-Tisch	Herolab	
Kamera	Herolab	

1.11.1 VORBEREITUNG DES AGAROSE-GELS

Nach erfolgter PCR wurde die amplifizierte DNA auf einem 2 %igen Agarose-Gel überprüft. Die in Tabelle 11 genannten Reagenzien wurden in der Mikrowelle bei 360 W circa 10 Minuten erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Dann wurde das Gel in etwa 5 mm Dicke auf ein sauberes Glas gegossen und zwei 24-zählige Kämme eingelegt, die nach dem Aushärten gezogen werden konnten. Diese Arbeitsschritte erfolgten unter einem Abzug und mit Verwendung von Latexhandschuhen, da Ethidiumbromid mutagen und toxisch ist.

Tab. 11: Reagenzien des 2%igen Agarosegels

Reagenzien	Menge	Hersteller
Agarosepulver	2g	Merck
TBE Puffer	100ml	Biochrom AG
Ethidiumbromid	50µl	Sigma

1.11.2 GELELEKTROPHORESE

Nach dem Erstarren des Gels wurde es in die Elektrophoresekammer gelegt, die an einem Spannungsgerät angeschlossen ist. Das Puffer-Reservoir wurde mit 1x TBE gefüllt, so dass das Gel gerade vollständig mit Puffer bedeckt war. Dort wurden je 5 µl PCR-Produkt und 3 µl Ladepuffer [10 mmol EDTA, 40% Sucrose, Bromphenolblau (Merck)] in die Taschen pipettiert; sowie in die letzte Tasche 5 µl Kb-Leiter aufgetragen. Zur Orientierung, wie weit die DNA-Stränge bereits gelaufen sind, dient der Ladepuffer. Die DNA wandert auf Grund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode, so dass sich die Geldaschen auf der Kathodenseite befinden müssen. Das Ethidiumbromid wandert in die entgegengesetzte Richtung zur Anode. Beim Aufeinandertreffen dieser Moleküle bindet sich Ethidiumbromid interkalierend zwischen die Basen der DNA – was durch seine fluoreszierenden Eigenschaften die DNA unter UV-Licht sichtbar macht. Das Gel lief 10 min bei 180 V und wurde nach dem Lauf unter Durchleuchtung von 302 nm ultraviolettem Licht auf einem Polaroid 667 Film aufgenommen.

1.12 ANALYSE DER FRAGMENTE

1.12.1 REAGENZIEN

Formamid 99,5%		Amresco
ROX Size Standard	Genescan® 400HD	Applied Biosystems
Laufpuffer mit 3% Polymer (Kathode):	1 ml 10 x Fragmentanalysepuffer	ABI
	4,3 g 7%iges Genescan Polymer	ABI
	4 g Harnstoff	
	steriles Wasser ad 10 ml	
Anodenpuffer mit 2% Polymer	5 ml 10 X Fragmentanalysepuffer,	ABI
	14,1 g 7%iges Genescan Polymer	ABI
	steriles Wasser ad 10ml	
Bestückung des Sequenzierers:	Anode 7,5 ml Anodenpuffer	
	1. Position: 1 ml Laufpuffer	
	2. Position: 1 ml aqua dest.	
	3. Position: 0,75 ml aqua dest.	
	4. Position: 0,5 ml 0,3 M Na OH	
	5. Position: 0,5 ml 1 M HCL	

1.12.2 DENATURIERUNG

Je nach Stärke der Bande in der vorausgegangenen Gelelektrophorese wurde von jedem der amplifizierten Nukleotidrepeats 1-2 µl für die weitere Vorbereitung verwendet. Zu jeder Probe wurden 9 µl Formamid und 0,3 µl ROX Size Standard 400HD hinzugefügt und die gesamte Mischung bei 3-4 min bei 96°C denaturiert. Um eine mögliche Wiederanlagerung zu verhindern, wurden die Proben bis zum Beladen des Sequenzers auf Eis gelagert. Die restliche DNA wurde für eventuelle Wiederholungsläufe eingefroren und wieder verwendet.

1.12.3 KAPILLAR-ELEKTROPHORESE

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des ABI 3100 Genescan-Sequenzierers, der zur Sequenz- und Fragmentanalyse verwendet wird. Dabei werden die zu analysierenden DNA-Fragmente über ihre Größe und ihre Fluoreszenzmarkierung identifiziert. Vor dem Lauf des Sequenzers wurden die denaturierten Proben zusammen mit den Reagenzien im Abschnitt 3.6.1. versehen und eine Kalibrierung der Schrittmotoren vorgenommen. Dieser ist mit Genescan-Kapillaren mit 75µm Innendurchmesser und einer Halterung für 384 Proben versehen. Mit Hilfe einer angelegten Spannung wandern die DNA-Fragmente durch die mit Polymer-Gel gefüllten Kapillaren. Ein Argonlaser, der über ein Spiegelsystem auf das Gel gelenkt wird, regt den Fluoreszenzfarbstoff an. Dabei erfolgt die elektrophoretische Auftrennung nach der Größe der Fragmente.

Die Fluoreszenzemission wird an einem Spektrograph in die Spektralfarben aufgebrochen. Diese Spektralfarben werden auf eine CCD-Sensor Oberfläche geleitet, wo sie spezifisch detektiert werden. Das System erlaubt die simultane Detektion verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe. Während der Elektrophorese werden die Daten durch einen Computer digital erfasst. Ein angeschlossener Power Macintosh 7200, auf dem die zugehörige Software ABI PRISM 3100 Collection installiert ist, steuert den Sequenzierer auf Grund der folgenden Voreinstellungen:

Länge bis zum Detektor	30 cm
Injektionszeit	10 s
Injektionsspannung	7,0 kV
Laufspannung	13,0 kV
Lauftemperatur	30°C
Laufzeit	18 min

Zusätzlich zu der untersuchten Probe wird in jeder Spur ein Längenstandard geladen (ROX Size Standard 400HD), der eine eigene Fluoreszenzmarkierung trägt. Mit Hilfe des internen Längenstandards können die Größen der untersuchten DNA-Fragmente bis auf 1bp genau berechnet werden.

1.12.4 ROHDATENVERARBEITUNG

Mit Hilfe des Programms „ABI Prism® GeneScan Analysis Software 3.7“, das auf einem angeschlossenen Rechner installiert ist, können die Rohdaten weiterverarbeitet werden. Der Sequenzierer bearbeitet maximal vier Fluoreszenzfarbstoffe, so dass neben den drei Primer-Farbstoffen ein weiterer für die Längenstandards (ROX Size Standard 400HD) verwendet wurde. Dieser weist folgende farbstoffmarkierte Oligonukleotide auf: 50, 60, 90, 100, 120, 150, 160, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 290, 300, 320, 340, 360, 380 und 400 bp. Wenn man diese Werte den dazugehörigen Peaks der Rohdaten zuordnet, kann die folgende Eichkurve erstellt werden, die für die gesamten Rohdaten eine Längenzuordnung ermöglicht.

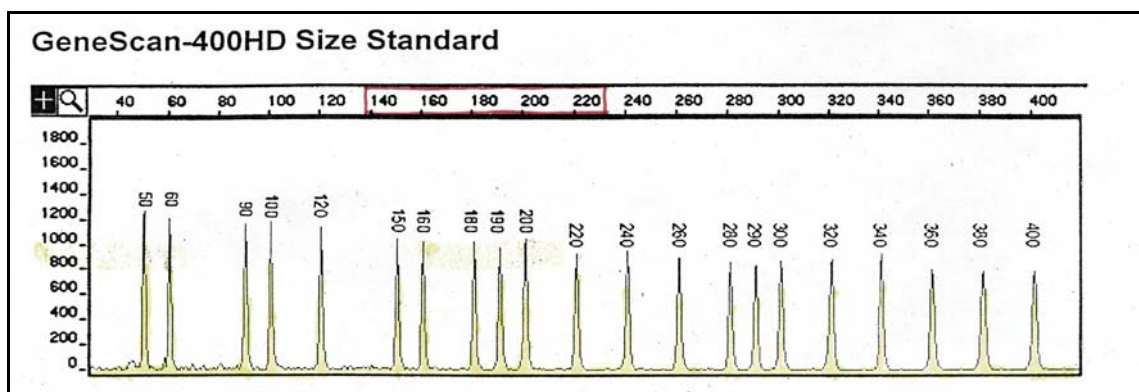


Abb. 5 Eichkurve des GeneScan-400HD Size Standard

Abhängig von der Größe der zu erwartenden Nukleotidsequenzen und von den eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffen, wurden im Rahmen der Voreinstellungen des Programms verschiedene Parameter für die Softwareanalyse eingestellt. Zur Markierung der DNA-Stränge wurden 6-Carboxyfluoreszein (6-FAM) sowie seine beiden Derivate Hexachloro-6-Carboxyfluoreszein (HEX) und Tetrachloro-6-Carboxyfluoreszein (TET) verwendet.

Tab. 12: Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Farbstoffe:

Farbstoffe	TET	6-FAM	HEX
Absorptionsmaximum (nm)	519	495	537
Emissionsmaximum (nm)	539	521	556

1.12.5 AUSWERTUNG AM BEISPIEL

Nachfolgend wird am Beispiel des Markers D21S215 (hier TET markiert) eine Auswertung erläutert. In einer neuen Datei wird die Eichkurve des Längenstandards voreingestellt (ROX ist rot). Dann werden die analysierten Rohdaten geöffnet und der Bereich vergrößert, in dem die Signale erwartet werden (hier zwischen 160 und 180 bp). Sollten die Signale schwach sein, kann die Y-Achse in größeren Intervallen gezeigt werden. Umgekehrt gilt dies auch bei sehr starken Signalen. Die Veränderung der Skala hat keinen Einfluss auf die Auswertung und dient nur den Gründen der Anschaulichkeit. Als weiterer Schritt muss ein Allel definiert werden.

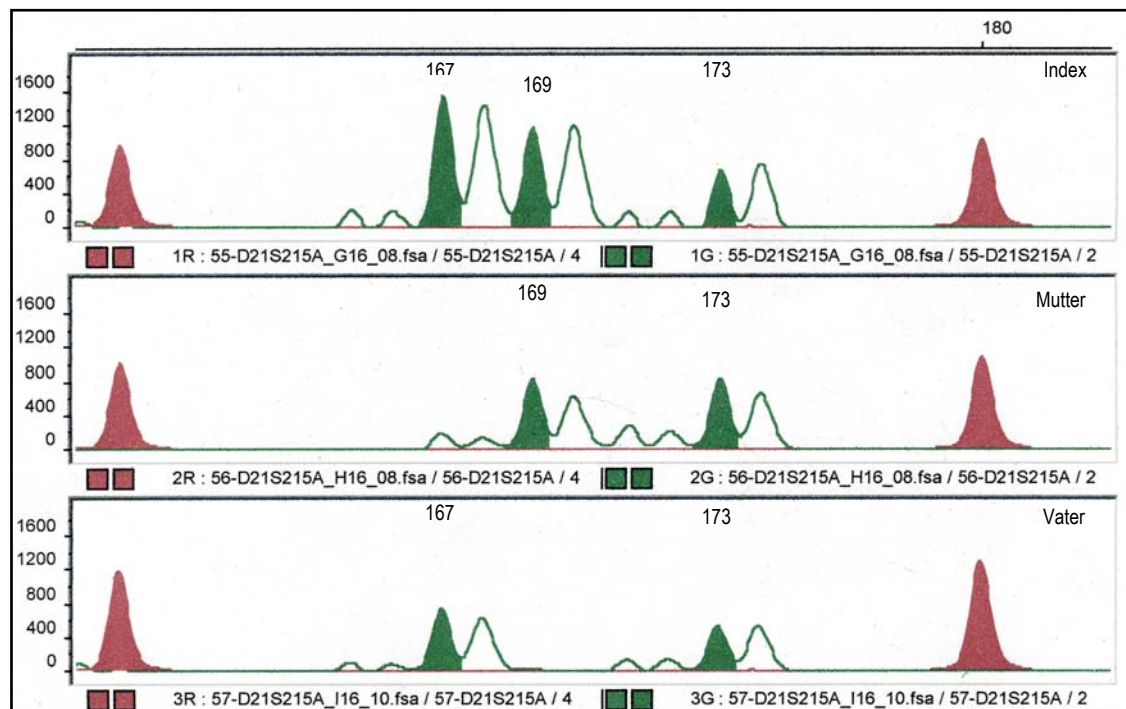


Abb. 6: : Beispielauswertung Index mit Trisomie 21

Im Beispiel oben besteht ein Allel aus zwei kleinen Vor-Peaks, dem tatsächlichen Allel-Peak, der durch Anklicken grün ausgefüllt wird und einem Nach-Peak. Die einzige Abweichung bildet das zweite Allel des Index. Es hat keine Vor-Peaks, weil es dicht nach dem ersten Allel folgt. Dieses Auswertungsmuster kehrt in anderen analysierten Daten des gleichen Markers wieder und muss nur bei einem anderen Marker neu definiert werden. Höhe und Fläche der Peaks gibt das Programm in einer Tabelle gesondert an.

An der Allelverteilung im Beispiel ist deutlich zu erkennen, dass das Index-Kind trisom für das Chromosom 21 ist. Der Vater hat das Allel 167 und die Mutter das Allel 169 an das Kind weitervererbt. Da die Eltern beide das Allel 173 besitzen ist hieraus noch nicht zu ersehen, wer von beiden das überzählige Chromosom 21 vererbt hat. Diese Frage lässt sich jedoch auf Grund der Konstellation weiterer Marker klären.

1.13 METHYLENTETRAHYDROFOLAT-REDUKTASE POLYMORPHISMUS

1.13.1 PERSONENAUSWAHL

Wie auch bei der Mikrosatellitenanalyse wurden die 117 Mütter mit einem Down Syndrom Kind auf den Polymorphismus hin untersucht. Zusätzlich zu den innerfamiliären Untersuchungen, dienten die Ergebnisse der Väter als Kontrollen.

1.13.2 GERÄTE UND REAGENZIEN

Die verwendeten Geräte werden wie in Kapitel 3.5. beschrieben eingesetzt. Die Reagenzien sind, sofern nicht anders in Tabelle 13 erwähnt, vom Hersteller Applied Biosystems.

1.13.3 PRINZIP DER REAKTION

Für die Untersuchung auf die Mutation im MTHFR-Gen wird extrahierte DNA (unter 3.3. beschrieben) benötigt. Mit Hilfe der PCR wird ein Bereich um den möglichen Nucleotidaustausch an Position 677 des MTHFR-Gens von C (Cytosin) nach T (Thymin) amplifiziert und mit einem Restriktionsenzym auf die Mutation hin untersucht. Die detaillierte Vorgehensweise ist in der Tabelle 13 (nach dem Protokoll des Herstellers, Applied Biosystems) beschrieben.

Die Auswertung erfolgt ebenfalls mit dem Programm „ABI Prism® GeneScan Analysis Software 3.7“, wobei jeweils nur ein schwarzer Peak für C (Cytosin), ein roter Peak für T (Thymin) oder beide Peaks gleichzeitig im Fall der Heterozygotie pro Probe auszuwerten ist.

Tab. 13: SNaP Shot Protokoll

1.) Exo I / Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) clean up

Je 5 µl des unten genannten Reaktionsgemisches werden zu je 5 µl PCR-Produkt gegeben, um ein Ausgangsvolumen von 10 µl zu erhalten.

Reagenzien	Menge 1x	Menge 110x
10x Exo I Puffer	0.50 µl	55.0 µl
10 U/µl Exo I Enzym	0.05 µl	5.5 µl
1 U/µl SAP Enzym	0.50 µl	55.0 µl
dH ₂ O	3.50 µl	385.0 µl
SAP Dephosphorylation Puffer	0.45 µl	49.5 µl

Anschließend wird alles bei 37°C für 60 min, dann bei 72°C für 15 min inkubiert und bis zum nächsten Schritt bei 4°C gekühlt.

2.) SNaP Shot Reaktion

Auf jede Tube der Mikrotiterplatte werden 1.5 µl, der unter Schritt 1 erstellten Mixtur und 3.5 µl des unten beschriebenen Gemisches verteilt.

Reagenzien	Menge 1x	Menge 110x
SNaP Shot Reaktions-Mix	0.625 µl	68.75 µl
677 C-T Primer mix	0.02 µl	2.2 µl
dH ₂ O	2.855 µl	314,05 µl

Die PCR Konditionen zur Programmierung des Cyclers:

96°C	10 sec	} 25 Zyklen
50°C	5 sec	
60°C	30 sec	
4°C	15 min	

3.) Entfernen ungebundener ddNTPs mit SAP

2 µl der folgenden Mischung hinzufügen:

Reagenzien	Menge 1x	Menge 110x
SAP Enzym	0.50 µl	105.0 µl
SAP Dephosphorylation Puffer	0.45 µl	94.5 µl
dH ₂ O	1.05 µl	220.5 µl

Anschließend wird alles bei 37°C für 60 min, dann bei 72°C für 15 min inkubiert und bis zum nächsten Schritt bei 4°C gekühlt.

4.) Proben für den ABI 3700 vorbereiten

Reagenzien	Menge 1x	Menge 110x
HiDi Formamid	9.50 µl	825.0 µl
SAP treated SNaP Produkt	0.3 µl	33 µl

Die Kapillarelektrophorese schließt sich nach dem gleichen Prinzip an, wie unter 3.6.3. beschrieben.

1.14 INTERVIEW

Bei allen Trisomie 21 Fällen sowie deren Kontrollen wurden nur die Mütter mit einem strukturierten Interview befragt. Diese Interviews wurden persönlich durchgeführt und zu Beginn gemäß dem folgenden Text auf einige allgemeine Dinge hingewiesen:

1.14.1 VORBEMERKUNGEN

„Bevor ich einige Fragen stelle, möchte ich auf einige Punkte hinweisen:

Ich bin Doktor und werde Ihre Antworten streng vertraulich behandeln. Dies gilt auch für die anderen Anwesenden. Keiner weiteren Person als die hier Anwesenden werden irgendwelche Informationen über Sie erhalten. Das, was Sie mir mitteilen, dient ausschließlich wissenschaftlichen Zwecken. Das Ziel unserer Untersuchung ist es, etwas über die Entstehung des Down Syndroms im Oman herauszufinden. Alle Daten werden anonymisiert ausgewertet, d.h. Ihr Name wird niemandem mitgeteilt und wird daher auch in keinem Bericht erscheinen.

Sie können zu jedem Zeitpunkt die Befragung abbrechen.

Selbstverständlich steht es Ihnen völlig frei, bestimmte Antworten zu verweigern. Mir ist es sogar lieber, wenn sie keine Antwort geben, als eine falsche Antwort, was immer auch die Gründe dafür sein mögen.

Ich bin gern bereit, Ihnen auf alle Fragen zu antworten, die sich Ihnen stellen. Ich wäre Ihnen aber sehr dankbar, wenn Sie damit möglichst bis zum Ende des Interviews warten würden.“

1.14.2 DATENBANK

Die Auswertung der Fragebögen erfolgte durch die Erstellung einer Datenbank. Wie unter 3.7.4. Beschrieben erfolgte hier ebenfalls die statistische Auswertung mit SPSS. Da es sich bei dieser Untersuchung um eine Pilotstudie handelt, liegt die Bedeutung der Datenbank nur im Hinblick auf die Generation von Hypothesen für spätere, weiterführende Untersuchungen.

Tab. 14: Der Fragebogen umfasst die folgenden Variablen:

ID-Nummer		
Soziodemographische Daten		
	Geburtstag und -ort	
	Geburtsland	
	ethnische Herkunft	
	höchster Schulabschluss	
Anamnese bisheriger Schwangerschaften		
	Gesamtzahl	
	Für jede einzelne Schwangerschaft:	Ausgang der SS Geschlecht Gewicht Art der Zeugung Fehlbildungen beim Kind gesundheitliche Schwierigkeiten beim Kind etwaige Todesursache
Anamnese der Schwangerschaft des Kindes mit Trisomie 21 und Verhütung		
	Tag des Schwangerschaftsendes	
	Schwangerschaftsdauer	
	Besonderheiten zum Konzeptionstermin	
	Etwaige medizinische Unterstützung für das Zustandekommen der Schwangerschaft	
	Frequenz des Geschlechtsverkehrs	
	Art der Antikonzeption	Methoden Zeiträume genaue Anamnese der verschiedenen Verhütungsmethoden
Bestehende oder vorangegangene Erkrankungen		
	Erkrankung an und Art der Behandlung von	Hypo-/Hyperthyreose Diabetes mellitus Hypertonus Epilepsien Asthma Leukämien Malignome Mononukleose Zoster Morbilli Herpes labiales / Herpes genitales Toxoplasmose Tropenkrankheiten Lupus erythematodes Rheuma Spondylitis ankylosans
Familienanamnese		
	Geschwister	Anzahl der lebend geborenen Geschwister Anzahl der tot geborenen Geschwister Anzahl der Geschwister mit Fehlbildungen
	Eltern	Alter bzw. Todesalter Erkrankung die zum Tode führte

Erkrankung von Familienmitgliedern an (inkl. Halbgeschwister an)	Leukämie Morbus Alzheimer Down Syndrom anderen Chromosomenanomalien
Verwandschaftsbezug zum Ehemann	
Menstruationsanamnese	
Eintritt der Menarche	
Unregelmäßigkeiten der Periode	
Zyklusdauer	
Ovarektomie	
Diagnostische und therapeutische Strahlenbehandlungen	
Häufigkeit und Zeitpunkt(e)	vor mehr als einem Jahr während des letzten Jahres Unmittelbar um den Konzeptionstermin herum
von röntgendiagnostischen Untersuchungen von	Knochen und Weichteilen Durchleuchtungen Thoraxuntersuchungen Abdomenübersicht Mammografie Magen-Darm-Passage Cholezystographie retrogradem Kontrasteinlauf Angiokardiographie IVP Schilddrüsenszintigrafie Phlebographie Arteriographie
Strahlenbehandlungen wegen	dermatologischer Erkrankungen Polypen Thymus-Erkrankungen malignen Tumoren Sonstigen Erkrankungen
Exogene Noxen	
Frequenz und Menge des Konsums von	Kaffe Tee Cola Coffein-Tabletten Drogen Zigaretten
Berufsanamnese	
Dauer der Beschäftigung	
Beschreibung der Tätigkeit	
Branche	
Kontakte durch Beruf oder Hobby mit	Schwermetallen Chemikalien Desinfektionsmitteln Anästhetika
Sonstiges	

ERGEBNISSE

1.15 AUSWERTUNG DER FRAGEBÖGEN

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nur ein Bruchteil der erfassten Daten des Fragebogens der Gesamtstudie ausgewertet. Der Schwerpunkt lag auf der molekulargenetischen Analyse der elterlichen Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 21, der Verteilung der Crossing-over, und der Analyse des MTHFR-Polymorphismus. Erfasst wurde aus den Fragebögen unter anderem das mütterliche und väterliche Alter, die Zahl der Schwangerschaften, Geschwisterfolge des Kindes mit Down Syndrom.

1.15.1 PARENTALE ALTERSVERTEILUNG ZUM ZEITPUNKT DER GEBURT DES KINDES MIT TRISOMIE 21

Insgesamt wurden 2318 Schwangerschaften von 246 Frauen in der Gesamtstudie erfasst. Das entspricht einer durchschnittlichen Anzahl von Schwangerschaften pro Frau von 9,4. Von den 2318 Schwangerschaften waren 180 Fehlgeburten. Dieses Ergebnis entspricht einem Anteil von 7,7%.

Die Erhebungen des mütterlichen und väterlichen Alters im Verhältnis zur Anzahl der Schwangerschaften beim Zeitpunkt der Geburt des Down Syndrom Kindes sind in Abbildung 7 und 8 graphisch dargestellt. Das mittlere Alter der Mütter betrug zu diesem Zeitpunkt 34 und das der Väter 41 Jahre. Das Down Syndrom Kind wurde durchschnittlich als 8,5tes Kind in der Geschwisterfolge geboren.

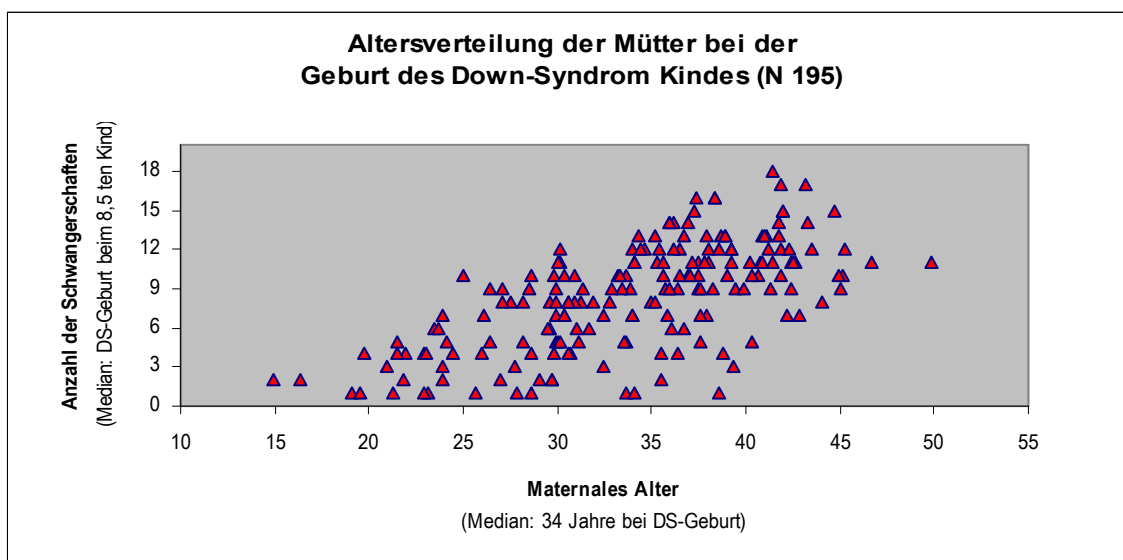


Abb. 7: Altersverteilung der Mütter

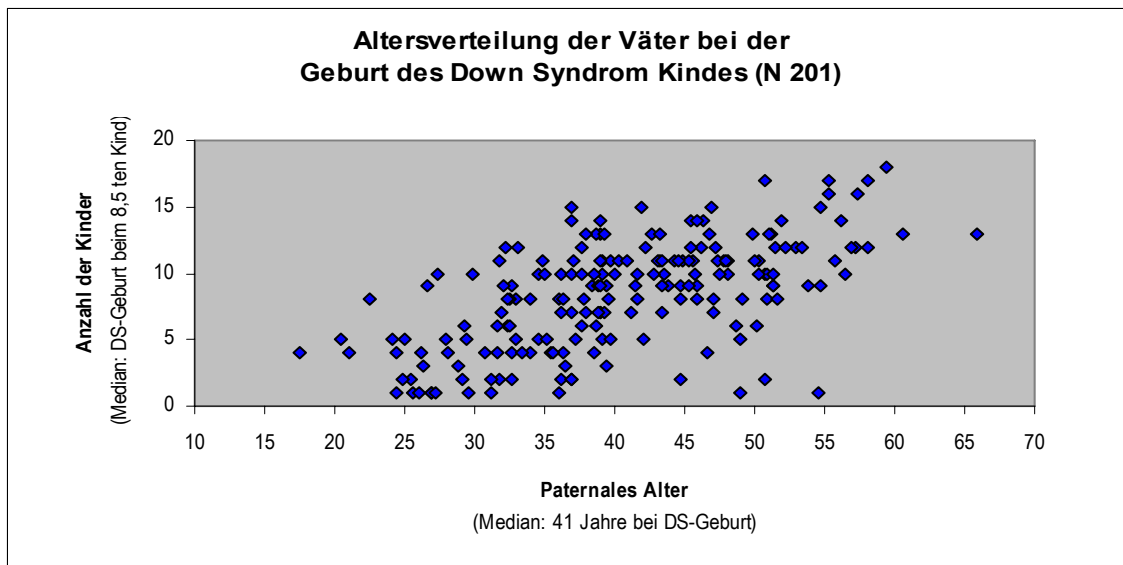


Abb. 8: Altersverteilung der Väter

1.15.2 ELTERLICHE GEOGRAPHISCHE HERKUNFT UND KONSANGUINITÄT

Die omanische Bevölkerung hat eine Einwanderungsquote von etwa 10 % vornehmlich aus den benachbarten Golfstaaten, der arabischen Halbinsel und einigen afrikanischen Staaten. Diese Angaben über die elterliche Herkunft spiegeln sich in der Abbildung 9 wider.

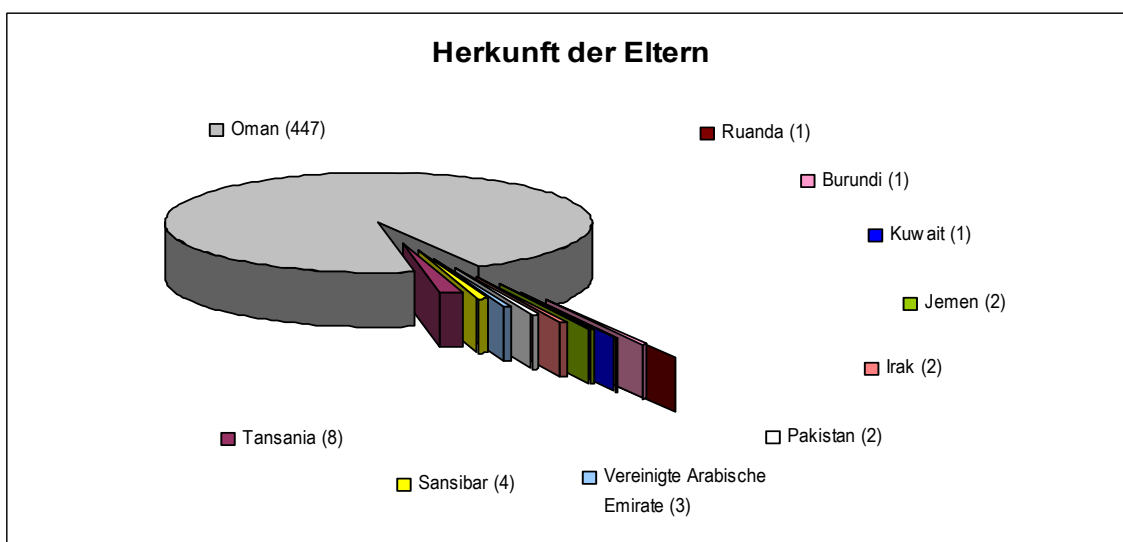


Abb. 9: Herkunftsländer der Eltern

Der Anteil an Verwandtenehen ist in der folgenden Grafik 9 abgebildet. Nach Unterteilung in 5 Verwandtschaftsgrade, ergab sich ein hoher Prozentsatz von 25 % erstgradig verwandter Eltern. Zählt man Cousins zweiten Grades, Ehen im gemeinsamen Familienstamm und die entfernt Verwandten hinzu, ergibt sich für fast 2/3 der untersuchten Familien eine hohe Konsanguinität.

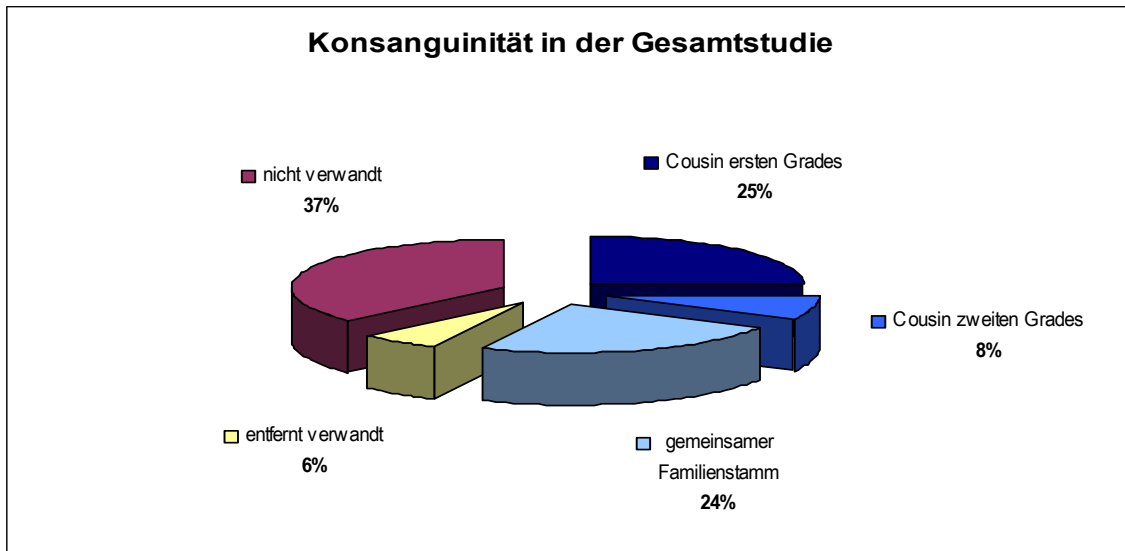


Abb. 10: Konsanguinität in der Gesamtstudie

1.15.3 GESCHLECHTERVERHÄLTNIS DER DOWN SYNDROM KINDER IM VERGLEICH MIT IHREN GESUNDEN GESCHWISTERN

In der Gesamtstudie ergab sich bei den 2001 gesunden Geschwistern der Down Syndrom Kinder ein Verhältnis von 1,09:1 (männlich:weiblich). Bei den 242 Down Syndrom Kindern aus der Gesamtstudie ergibt sich eine Verschiebung zugunsten der Jungen mit einem Verhältnis von 1,37:1. Von den molekulargenetisch untersuchten 98 Down Syndrom Kindern, deren Geschlecht bekannt war, ergab sich ein Wert von 1,65:1 (männlich:weiblich) und von deren 747 gesunden Geschwistern ein Verhältnis von 1,27:1 (männlich:weiblich).

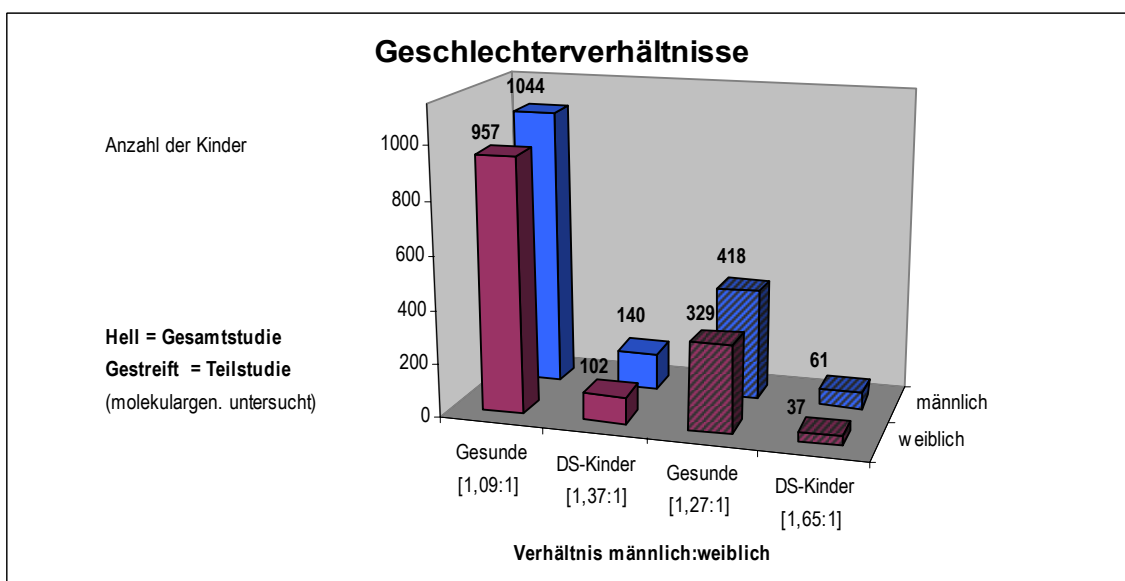


Abb. 11: Geschlechterverhältnisse sind in der Gesamt und Teilstudie bei Down Syndrom Kindern deutlich zugunsten der Jungen verteilt

1.16 MOLEKULARGENETISCHE ANALYSE DER NON-DISJUNCTION- UND CROSSING-OVER EREIGNISSE

Im Hinblick auf die chromosomalen Fehlverteilungen wurden für die 110 untersuchten Familien die nachstehenden molekulargenetischen Ergebnisse gefunden. Die Abbildung 12 zeigt maternale Fehlverteilungen der Meiose I in 57 Fällen (51%) und der Meiose II in 15 Fällen (14%). Betrachtet man diese 72 voll informativen maternalen Meiosen, so ergibt sich ein Verhältnis von Meiose I zu Meiose II von 80:20. Weitere 19% der untersuchten Meiosen konnten eindeutig auf maternale Herkunft zurückgeführt werden, die Meiose war indes nicht informativ. In 2 Fällen könnte es sich sowohl um mitotischen Ursprung oder einen Meiose 2 Fehler handeln. Die restlichen 14% der Meiosen waren nicht informativ. Bemerkenswerter Weise fanden sich unter den 93 Meiosen, die bezüglich der Paternität informativ waren, kein paternales Non-disjunction Ereignis. In einem Fall musste die Vaterschaft angezweifelt werden. Diese Quote von 0,9% ist im Vergleich zu weltweiten Daten sehr gering.

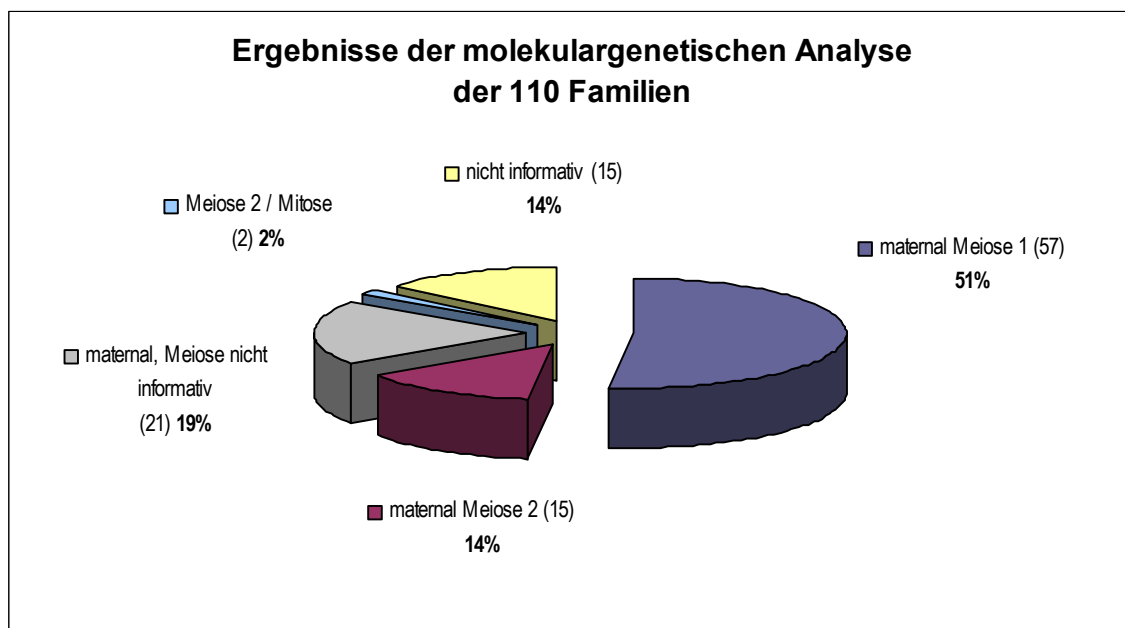


Abb. 12: Ergebnisse der molekulargenetischen Analyse zur Paternalität und zum Non-disjunction in M I und M II

Analog zu [Lamb et al. 2005] wurde das Chromosom 21 in sechs annähernd gleichgroße Intervalle aufgeteilt: Intervall 1 (D21S215-D21S1432), Intervall 2 (D21S1432-D21S1414), Intervall 3 (D21S1414-D21S1258), Intervall 4 (D21S1258-D21S1445), Intervall 5 (D21S1445-D21S1252) und Intervall 6 (D21S1252-D21S1890). Im Anschluss wurden die Crossing-over Häufigkeiten pro Region ermitteln.

Bei der Auswertung aller Rekombinationen ergaben sich gehäuft Crossing-over in den zentromer- und telomernahen Intervallen. Aufgeschlüsselt nach Meiose I und Meiose II und nicht informativen maternalen Meiosen, zeigten sich charakteristische Verteilungsmuster (Abb.13).

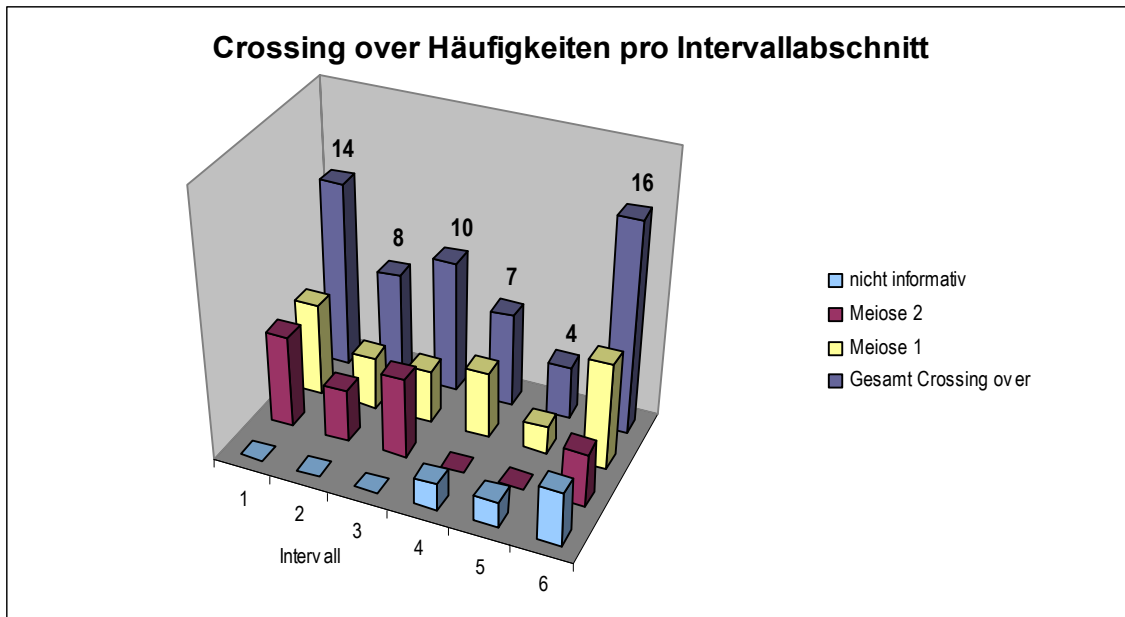


Abb. 13: Crossing-over Häufigkeiten pro Intervallabschnitt

Bringt man zusätzlich das mütterliche Alter in Verbindung mit den Crossing-over Häufigkeiten, so finden sich die häufigsten Rekombinationen nahe des Zentromers und Telomers bei Frauen unter 29. Ähnlich verhält es sich bei der Altersgruppe 30-35 Jahre. Bei älteren Müttern von Down Syndrom Kindern über 36 Jahre finden sich häufiger Crossing-over, die in den mittigen Intervallen liegen. Die oben beschriebenen Beobachtungen in Abbildung 14 gelten für die Meiose I.

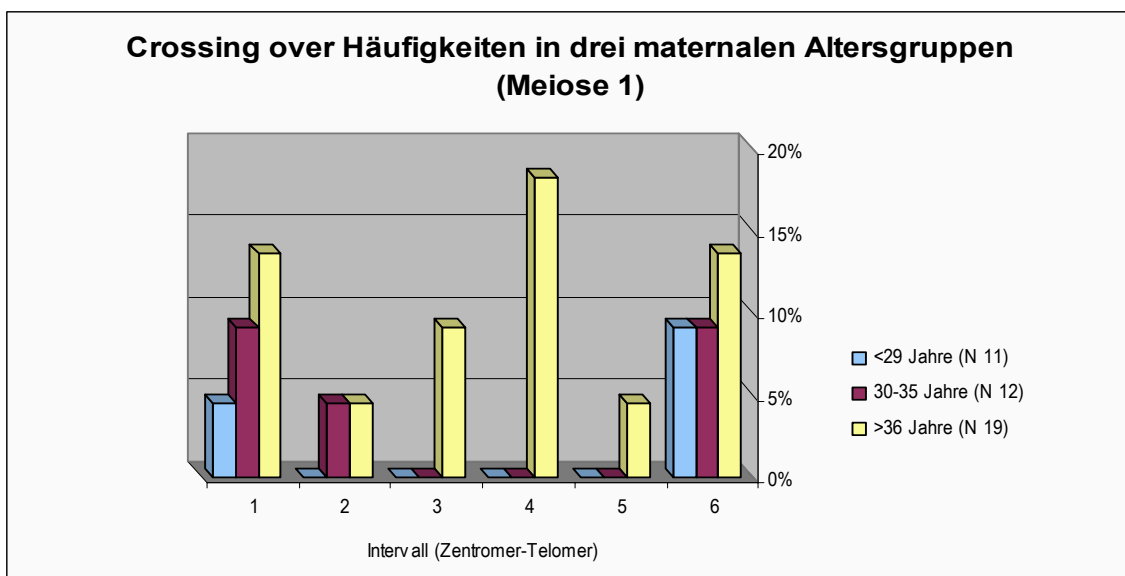


Abb. 14: Crossing-over Häufigkeiten in drei maternalen Altersgruppen, in denen eine Fehlverteilung der Meiose 1 auftrat.

Für die Meiose II-Fehlverteilungen ergibt sich eine Häufung von Crossing-over in dem telomernahen Intervall 6. Auf Grund der geringen Zahl der gefundenen Meiose II-Fehler, sind hier weitergehende Schlussfolgerungen nicht möglich.

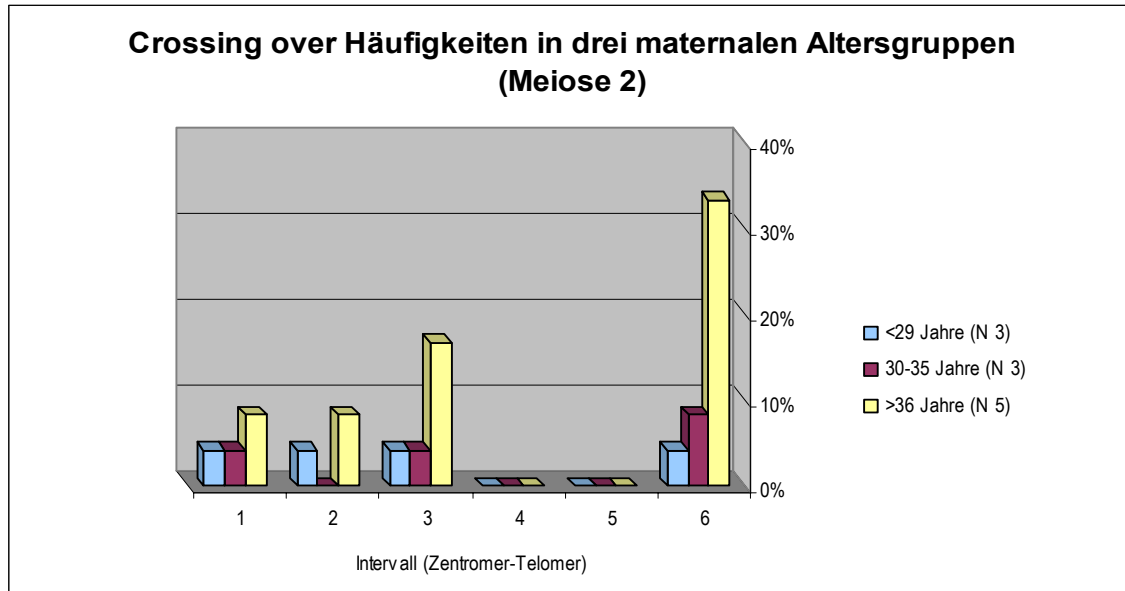


Abb. 15: Crossing-over Häufigkeiten in drei maternalen Altersgruppen, in denen eine Fehlverteilung der Meiose 2 auftrat.

1.17 MTHFR-POLYMORPHISMUS

Die Genotypen von 83 Indexpatienten und deren Eltern werden in Tabelle 15 angegeben. Die höchste CC Frequenz von 87% wurde bei den Nachkommen gefunden. Verglichen mit ihren Eltern die etwa 78% aufweisen, deutet das auf ein Ansteigen der CC Häufigkeit unter betroffenen Kindern hin.

Betrachtet man die informativen Situationen, in denen einer der beiden Eltern heterozygot ist (CT), so zeigt sich, dass das C-Allel präferenziell an das Kind mit Down Syndrom weitergegeben wird (Tabelle 18).

Tab. 15: Genotyp Frequenzen für MTHFR 677 unter Down Syndrom Kindern und ihren Eltern

	Genotyp (%)		
	CC	CT	TT
Indices	72 (87%)	9 (11%)	2 (2%)
Mütter	63 (76%)	19 (23%)	1 (1%)
Väter	65 (78%)	18 (22%)	0 (0%)

Die Frequenzen der anderen möglichen Mutter-Vater-Kind Konstellationen dieser 83 Familien sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tab. 16: Ermittelte und erwartete Genotypen unter Down Syndrom Kindern basierend auf elterlichem Genotyp

* Das Ergebnis wurde nicht mitgezählt, weil die Vaterschaft nicht stimmt.

Genotyp paternal / maternal	Anzahl der Nachkommen	Ermittelter vererbter Genotyp		
		CC	CT	TT
CC / CC	51	51	[1]*	
CC / CT	13	10	3	
CT / CC	12	8	4	
CC / TT	1		1	
CT / CT	6	3	1	2
TT / CC	0			
CT / TT	0			
TT / CT	0			
TT / TT	0			
Gesamt	83	72	9	2

1.18 ERGEBNISSE DER FAMILIE MIT 10 BETROFFENEN KINDERN

In der Abbildung 16 wurden die 11 orange markierten Personen des Stammbaums molekulargenetisch untersucht. Die Fotos in Abbildung 17 zeigen die 5 Down Syndrom Kinder der untersuchten Teilfamilie. Mit Hilfe von 21 Mikrosatellitenmarkern, die das Chromosom 21 abdecken, konnten Crossing-over Häufigkeiten, die elterliche Herkunft des überzähligen Chromosoms ermittelt werden. Da es sich bei dieser Familie um eine Translokations-Trisomie handelt, wurden zusätzlich auch 6 Marker für das Chromosom 14 verwendet.

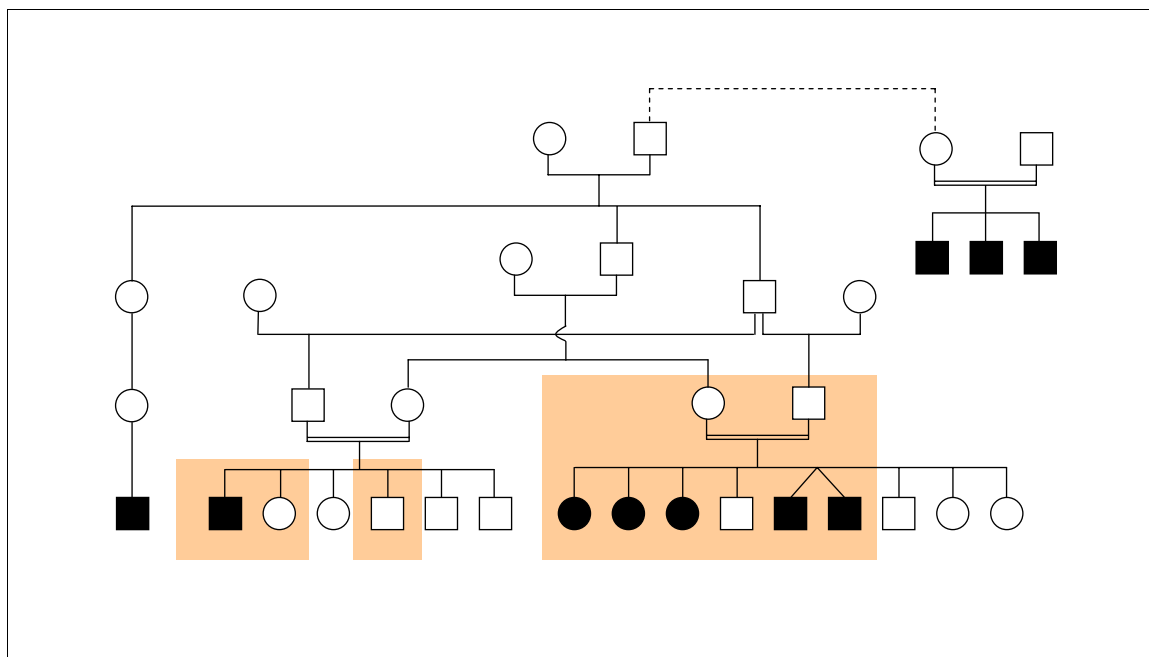


Abb. 16: Stammbaum der Familie mit 10 betroffenen Kindern; die markierten Personen wurden untersucht

Die beiden Zwillinge stellten sich durch die molekulargenetischen Ergebnisse als eindeutig eineiig heraus, obwohl sich dieses Ergebnis auf Grund der phänotypischen Erscheinung auf den Fotos in Abbildung 17 nicht zwingend vermuten ließ. Die 3 untersuchten Kinder aus dem Seitenzweig der Familie weisen viele gemeinsame Allele mit ihren Cousins und Cousinen aus der Kernfamilie auf. Die farblich unterlegten Allele stammen soweit mit den anderen Allelen überein, weil in dieser Familie laut Stammbaum seit mehreren Generationen Konsanguinität vorliegt. Hier konnte die Trisomie 21 bei einem Jungen bestätigt werden, dessen Schwester und Bruder nicht betroffen sind.

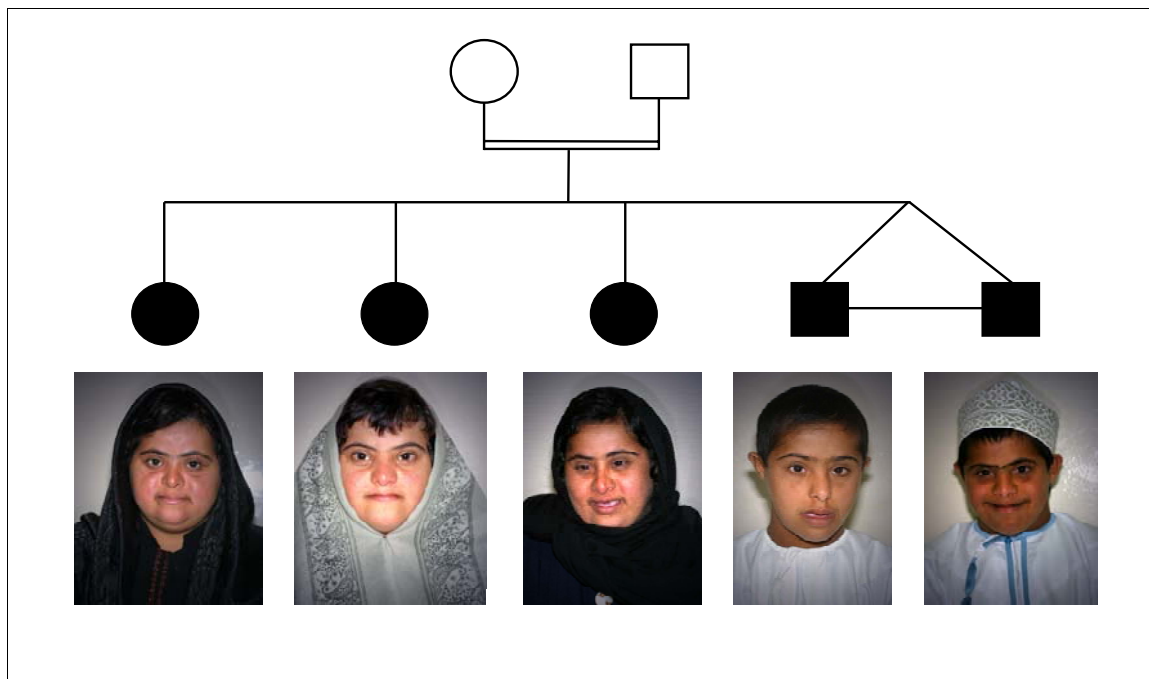


Abb. 17: Fotos der betroffenen Kinder aus der untersuchten Teilfamilie

Abbildung 19 verdeutlicht die molekulargenetischen Ergebnisse. Links oben sind schematisch die Chromosomen 21 und 14 dargestellt. Zur Veranschaulichung wurden die zytogenetischen Lokalisationen der verwendeten Marker schematisch eingezeichnet. Auf diese Reihenfolge der Mikrosatellitenmarker beziehen sich die Ergebnisse der Basenpaarlänge für die jeweilige Person. Orientierend wurde ein Teil des Stammbaums in dieser Darstellung mit beibehalten. Die Hintergrundfarben wurden willkürlich rot und gelb für maternale Allele festgelegt und grün bzw. blau für die paternalen Allele. Konnte ein Allel nicht eindeutig zugeordnet werden, ist der Hintergrund weiß. Überdies werden die Karyotypen der untersuchten Personen angegeben.

Alle 5 betroffenen Kinder haben das überzählige Chromosom 21 von der Mutter erhalten, wobei es einige Crossing-over zwischen den maternalen Chromosomen gab. Das Translokations-Chromosom ist in diesem Fall das rot unterlegte. Auffällig ist, dass es offenbar kein Crossing-over zwischen den paternalen Chromosomen 21 gab. Es fällt ebenfalls auf, dass der Vater nur an den gesunden Sohn, der gleichzeitig der Translokations-Träger ist, das grün markierte Chromosom vererbte. Alle 5 erkrankten Kinder erhielten hingegen das blaue Chromosom vom Vater.

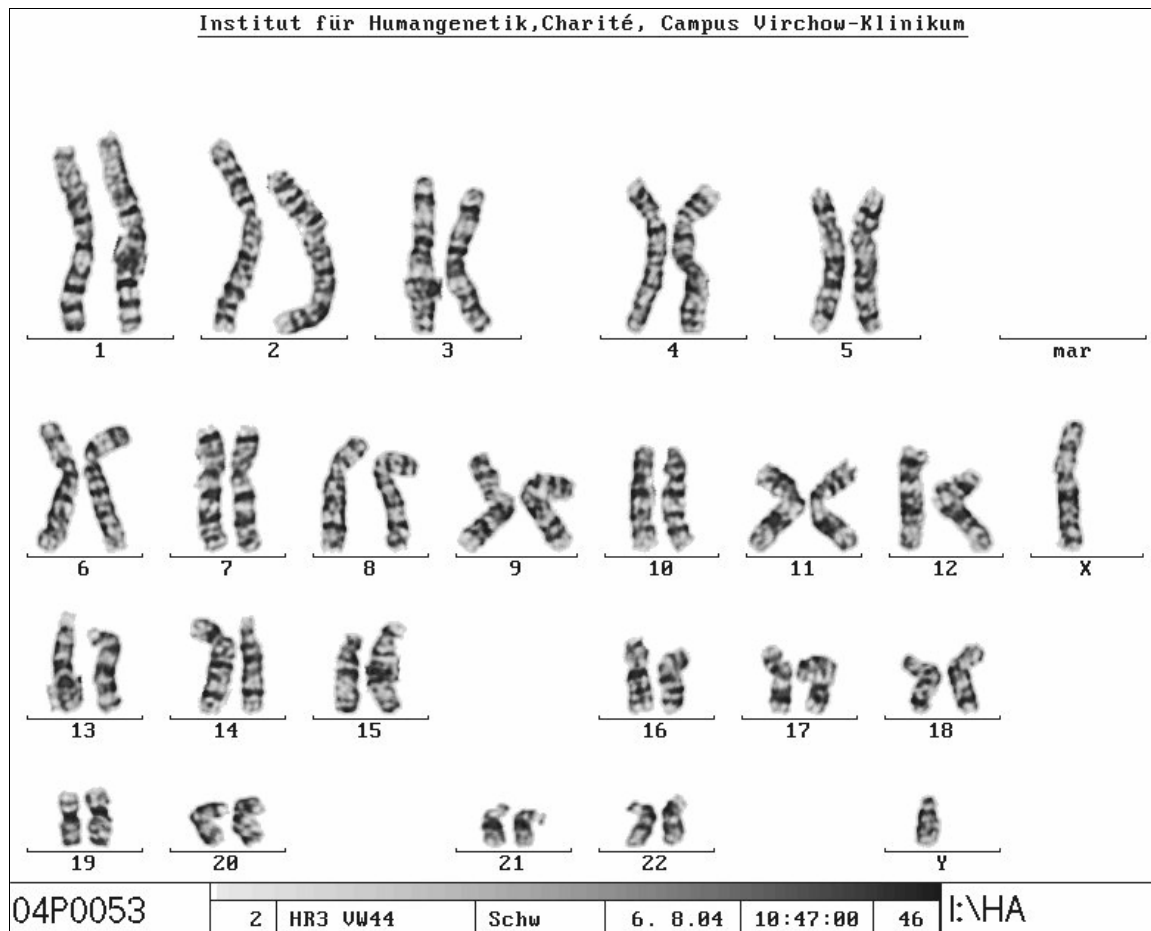


Abb. 18: Karyogramm einer Translokations-Trisomie eines betroffenen Sohnes

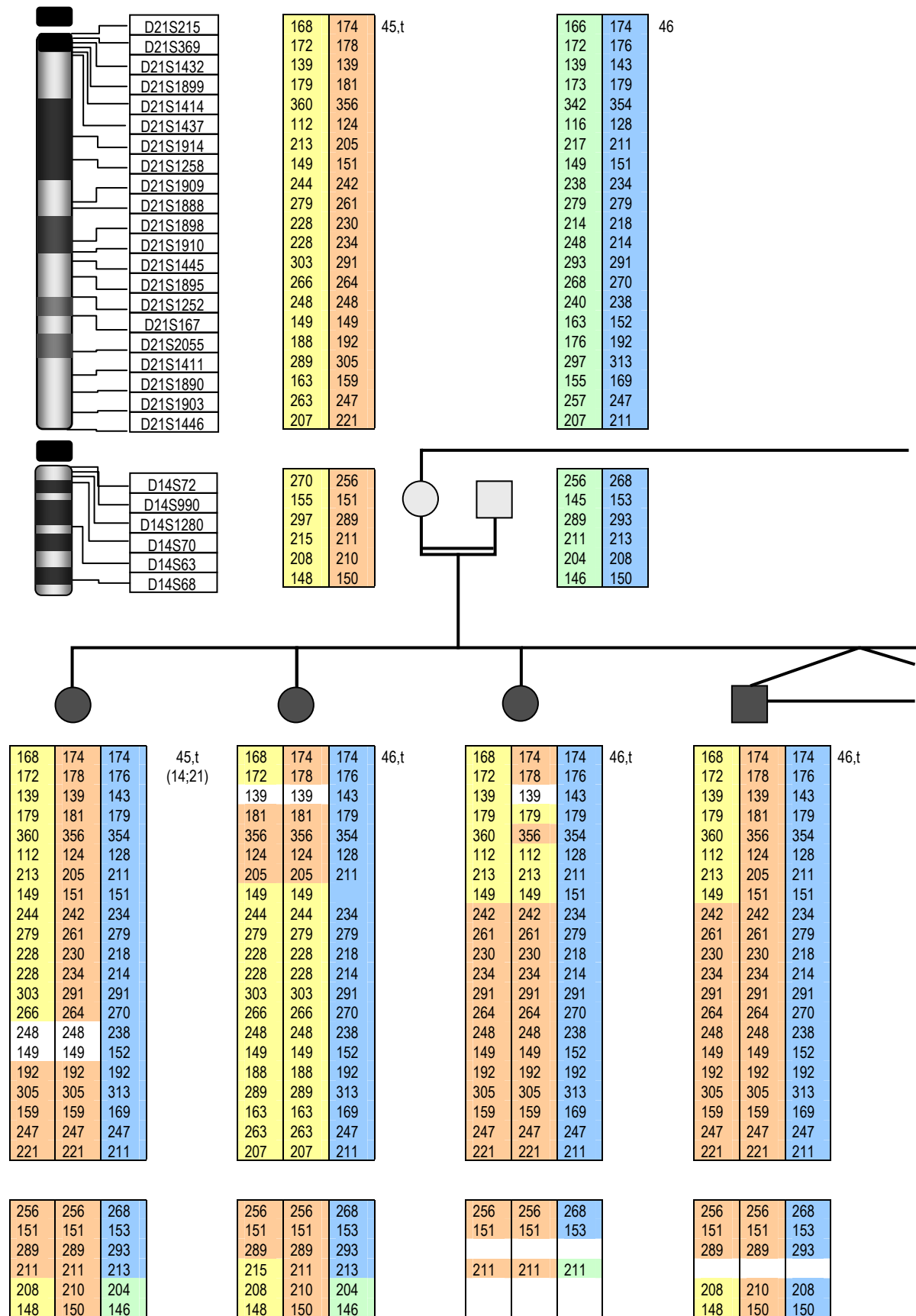
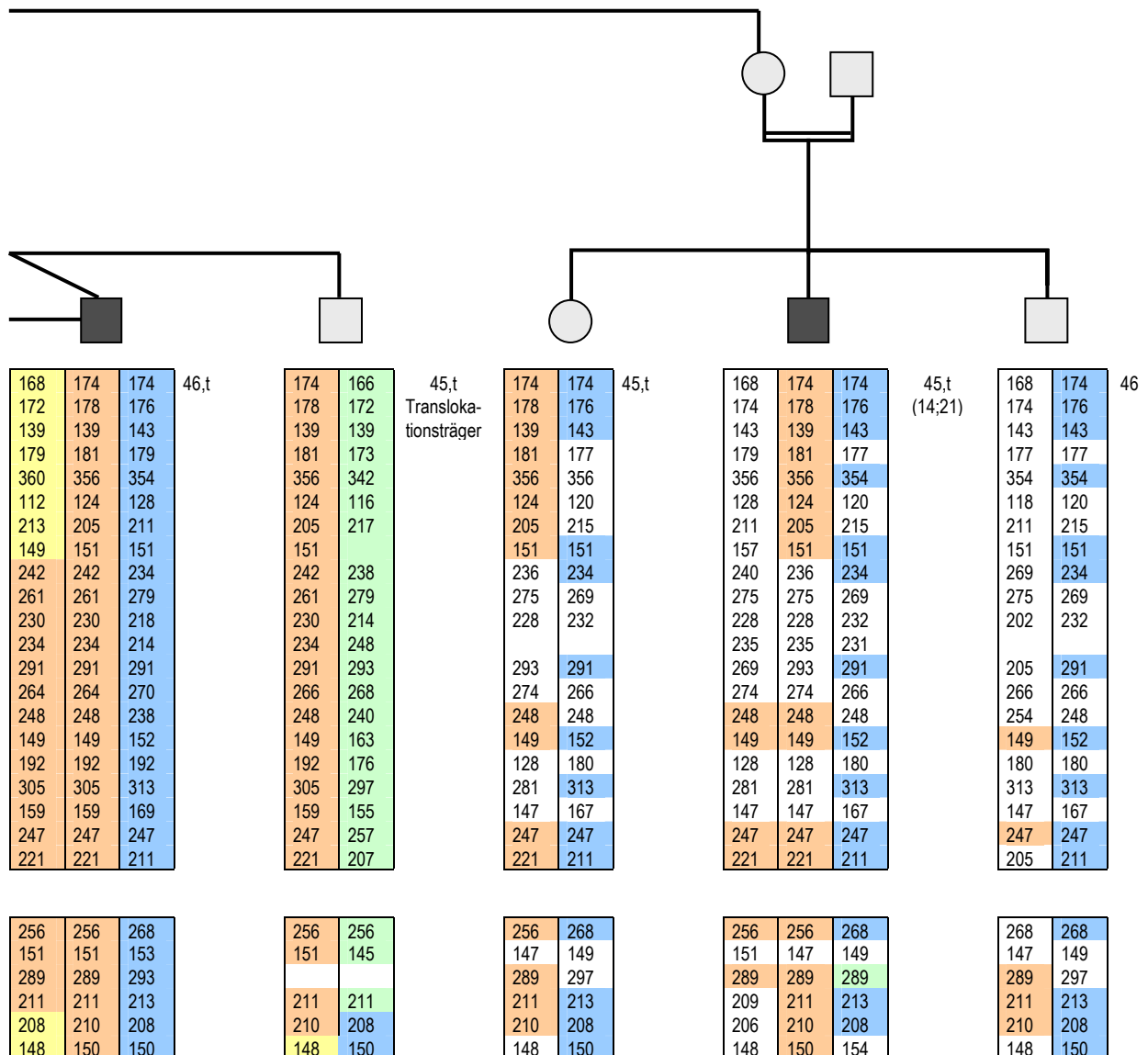

















Abb. 19: Ergebnisse der Familie mit 10 betroffenen Kindern



ERGEBNISANHANG ROHDATEN

	maternales Allel		mat M I	maternal Meiose 1
	maternales Allel		mat M II	maternal Meiose 2
	paternales Allel		mat M ni	maternal Meiose nicht informativ
	paternales Allel		ni	maternal/paternal & Meiose nicht informativ
	Allel ist nicht zuzuordnen		ni M II /	maternal Meiose 2 oder Mitose
	230 Basenpaarlänge des Allels		mitotisch	
	Vaterschaft fraglich		SNP	MTHFR-Polymorphismus
	der Marker links bezieht sich auf die Werte der gesamten Zeile			Legende

	Kind/2	Mutter/2	Vater/2	mat M I	Kind/4	Mutter/4	Vater/4	mat M I
D21S215	170 172 174	170 172	174 168		172 170 174	172 170	174 172	
D21S1414	356 356 352	348 356	352 356		352 352 366	352 352	366 352	
D21S1258	141 141 149	141 141	149 149		147 151 149	147 151		
D21S1445	289 289 289	305 289	289 291		269 273 291	269 273		
D21S1252	234 234 240	230 234	240 248		230 246 230	230 246		
D21S1890	151 151 151	157 151	151 165		151 157 169			
SNP	C-C	C-C	C-C		C-C	C-C	C-T	
	Kind/6	Mutter/6	Vater/6	mat M I	Kind/8	Mutter/8	Vater/8	mat M II
D21S215	168 174 170	168 174	170 170		174 174 168	174 170	168 174	
D21S1414	352 360 348	352 360	348 344		362 362 348	344 362	348 348	
D21S1258	147 149 147	147 149	147 149		141 141 137	149 141		
D21S1445		287 291	291 305					
D21S1252	230 236 230	230 236	230 230			238 242	230 238	
D21S1890		155 167	147 163		137 149 153	137 149	153 149	
SNP	C-T	C-T	C-C				C-C	
	Kind/9	Mutter/9	Vater/9	mat M I	Kind/10	Mutter/10	Vater/10	mat M I
D21S215	168 168 174	168 168	174 170		170 174 170	170 174	170 170	
D21S1432	143 147 139	143 147	139 139					
D21S1414	352 352 352	352 352	352 352		348 348 362	344 348	362 362	
D21S1258		149 151	147 151		151 151 151	157 151	151 157	
D21S1445					289 297 291	289 297	291 269	
D21S1252	226 236 244	226 236	244 246		240 242 250	240 242	250 246	
D21S1890	155 157 151	155 157	151 167		155 155 159		159 151	
SNP	C-C	C-T	C-C		C-C	C-C	C-T	
	Kind/11	Mutter/11	Vater/11	mat M I	Kind/12	Mutter/12	Vater/12	mat M I
D21S215	170 172 168		168 170		168 170 172	168 170	172 170	
D21S1414	344 366 362	344 366	362 340		344 348 354	344 348	354 362	
D21S1258								
D21S1445	291 269 291					309 313	269 269	
D21S1252	250 254 248	250 254			246 248 252	246 248	252 250	
D21S1890	165 167 165	165 167	165 167		157 163 153	157 163	153 159	
SNP	C-C					C-C	C-C	
	Kind/15	Mutter/15	Vater/15	ni	Kind/16	Mutter/16	Vater/16	mat M I
D21S215	170 170 170	170 170	170 174		170 172 168	170 172	168 174	
D21S1432	147 139 147	139 147	147 143					
D21S1414	348 348 348	348 348	348 372		344 348 358	344 348	358 348	
D21S1258								
D21S1445	269 269 305	269 269			269 291 301	269 291		
D21S1252		230 236	230 236		230 240 230	230 240	230 230	
D21S1890					149 149 167	155 149	167 147	
SNP	C-C		C-C		C-C	C-C	C-C	
	Kind/17	Mutter/17	Vater/17	mat M II	Kind/18	Mutter/18	Vater/18	mat M ni
D21S215	168 168 168	174 168	168 174		168 174 168	168 174	168 170	
D21S1432					143 151 139	143 151	139 149	
D21S1414	358 358 356	358 358	358 348		362 362 362	362 362	362 352	
D21S1258	141 151 143	141 151	143 153		149 149 149	149 149	149 151	
D21S1445					267 291 267	267 291	267 291	
D21S1252	230 244 248	230 244	248 230		230 248 248	230 248	248 230	
D21S1890	151 151 161	155 151			151 151 163	151 153	163 151	
SNP		C-C	C-C		C-C	C-T	C-C	

	Kind/19	Mutter/19	Vater/19	mat M ni	Kind/22	Mutter/22	Vater/22	mat MI
D21S215	170 174 170	170 174	170 170		168 174 174	168 174	174 170	
D21S1414	344 352 348	344 352	348 358		352 352 358	352 352	358 362	
D21S1258	141 153 151	141 153	151 149		141 151 149	141 151	149 147	
D21S1445	269 287 269	269 287			269 291 269	269 291	269 269	
D21S1252		238 240			230 246 242	230 246	242 246	
D21S1890	159 167 169	159 167			165 169 151	165 169	151 165	
SNP	C-C	C-C	C-C		C-C	C-C	C-T	
	Kind/23	Mutter/23	Vater/23	mat MI	Kind/24	Mutter/24	Vater/24	mat MI
D21S215	168 172 168	168 172	168 168		170 172 168	170 172	168 172	
D21S1414	344 356 344	344 356	344 352		362 362 358	358 362	358 348	
D21S1258	149 151 149	149 151	149 151		149 149 151	149 149	151 153	
D21S1445	293 305 273	293 305	273 301		309 309 289	289 309	289 289	
D21S1252	232 234 240	232 234			250 250 238		238 238	
D21S1890	159 159 149	161 159			153 153 151		151 169	
SNP	C-C	C-C	C-C		C-C	C-C	C-C	
	Kind/25	Mutter/25	Vater/25	ni	Kind/28	Mutter/28	Vater/28	mat MII
D21S215	170 174 174	170 174	174 170		170 170 170	172 170	170 170	
D21S1432	139 139 139	139 139	139 143					
D21S1414		344 348	344 358		358 358 344	368 358	344 358	
D21S1258		149 151	141 149		149 151 151	149 151	151 141	
D21S1445		269 285	269 291		301 305 269		269 305	
D21S1252		244 244	238 248		238 248 250	238 248	250 248	
D21S1890		167 169	151 167		155 165 159	155 165	159 163	
SNP		C-C	C-C		C-C	C-C	C-C	
	Kind/30	Mutter/30	Vater/30	mat M II	Kind/33	Mutter/33	Vater/33	ni
D21S215	168 168 168	170 168	168 168		170 170 170	170 170	170 174	
D21S1432						147 151	139 151	
D21S1414	344 362 348	344 362	348 350		344 348 344	344 348	344 352	
D21S1258	141 141 151	141 141	151 147		151 149 151	151 149	151 149	
D21S1445	269 305 273	269 305	273 293					
D21S1252	236 238 246	236 238	246 250			238 244	238 238	
D21S1890	163 163 155	165 163	155 153		165 167 165	165 167	165 151	
SNP	C-C	C-C	C-C		C-C	C-C	C-C	
	Kind/34	Mutter/34	Vater/34	mat M I	Kind/39	Mutter/39	Vater/39	mat M II / mitotisch
D21S215	170 174 168	170 174	168 168		174 174 170	170 174	170 174	
D21S1414	356 362 344	356 362	344 362		348 348 362	340 348	362 340	
D21S1258	141 151 151	141 151	151 147					
D21S1445					291 291 269	291 291		
D21S1252	248 248 246	250 248	246 244		238 238 240	230 238	240 246	
D21S1890	163 163 161	161 163	161 169		155 155 151	155 155	151 161	
SNP	C-C	C-C	C-C		C-C	C-C	C-C	
	Kind/41	Mutter/41	Vater/41?	MI	Kind/51	Mutter/51	Vater/51	mat M ni
D21S215	170 172 174	170 172	174 168		168 170 170	168 170	170 168	
D21S1432					139 143 143	139 143		
D21S1414	352 352 362	358 352	348 362		348 348 344	348 348	344 348	
D21S1258	141 141 141	151 141	147 149		141 149 151	141 149	151 141	
D21S1445					289 305 269	289 305	269 305	
D21S1252	228 246 238	228 246	236 244		230 230 250	244 230	250 244	
D21S1890	157 169 161	157 169	147 157		167 167 155	155 167	155 167	
SNP	C-T	C-C	C-C		C-C	C-C	C-C	
	Kind/52	Mutter/52	Vater/52	mat M I	Kind/53	Mutter/53	Vater/53	mat M ni
D21S215	168 170 172	168 170	172 170		174 174 170	170 174	170 174	
D21S1414	344 352 344	344 352	344 356		358 358 362	358 358	362 358	
D21S1258	147 147 151	147 147	151 151		149 151 149	149 151	149 151	
D21S1445	289 305 269	289 305	269 265					
D21S1252	240 244 246	240 244	246 244		230 230 246	244 230	246 246	
D21S1890	167 167 167	161 167	167 157		165 165 167	171 165	167 163	
SNP	C-C	C-T	C-T		C-C		C-C	

				mat M II				mat M II
D21S215	Kind/54	Mutter/54	Vater/54		Kind/59	Mutter/59	Vater/59	
D21S1432	174 174 168	168 174	168 170		174 174 170	170 174	170 174	
D21S1414	135 143 143	135 143	143 139					
D21S1258	348 348 348	344 348	348 344		362 362 348	344 362	348 340	
D21S1445	141 141 151	149 141	151 141		141 151 141	141 151	141 149	
D21S1252	269 269 291	273 269	291 269		269 305 269	269 305	269 291	
D21S1890	248 248 230	248 248	230 230		238 238 236	238 238	236 230	
SNP	161 161 165	151 161	165 167		171 169 167	171 169	167 165	
	C-C	C-C	C-C		C-C	C-C	C-C	
D21S215	Kind/60	Mutter/60	Vater/60	mat M I	Kind/61	Mutter/61	Vater/61	mat M ni
D21S1414	170 174 172	170 174	172 170			168 168	170 174	
D21S1258	352 358 358	352 358	358 358		348 358 366	348 358	366 348	
D21S1445					141 149 141	141 149	141 137	
D21S1252	291 299 299	291 299	299 299		269 291 305	269 291	305 277	
D21S1890	236 246 244	236 246	244 244		236 248 250	236 248	250 226	
SNP	129 169 159	129 169	159 153		167 169 153	167 169	153 155	
	C-T	C-T	C-C		C-C	C-C	C-C	
D21S215	Kind/66	Mutter/66	Vater/66	mat M I	Kind/78	Mutter/78	Vater/78	mat M I
D21S1414	168 170 168	168 170	168 170		170 168 170	170 168	170 172	
D21S1258	344 348 358	344 348	358 362		352 352 352	352 352	352 334	
D21S1445	141 141 141	151 141	141 151		147 149 149	147 149	149 153	
D21S1252	269 285 291	269 285	291 291		305 305 291	305 305	291 301	
D21S1890		238 242			246 248 236	246 248	236 242	
SNP	155 151 151	155 151	151 161		155 167 159	155 167	159 159	
	C-C	C-T			C-C	C-C	C-C	
D21S215	Kind/81	Mutter/81	Vater/81	mat M I	Kind/83	Mutter/83	Vater/83	mat M II
D21S1414	172 174 170	172 174	170 174		178 178 168	170 178	168 174	
D21S1258	344 348 348	344 348	348 344		348 352 362	348 352	362 344	
D21S1445	147 147 153	147 147	153 147				149 149	
D21S1252	267 267 307	267 267	307 267		267 267 387	267 267	387 307	
D21S1890	244 248 236	244 248	236 244		230 238 244	230 238	244 250	
SNP	151 167 163	151 167	163 149		165 157 165	165 157	165 173	
	C-C	C-T	C-C		C-C	C-C	C-C	
D21S215	Kind/85	Mutter/85	Vater/85	mat M I	Kind/87	Mutter/87	Vater/87	mat M I
D21S1414	168 174 182	168 174	182 170		172 170 170	172 170	170 170	
D21S1258	348 352 358	348 352	358 352		358 358 344	348 358	344 348	
D21S1445	151 151 143	151 151	143 149		141 151 141		141 141	
D21S1252	291 291 269	291 291	269 291		273 281 291	273 281	291 269	
D21S1890	230 246 230	230 246	230 236		230 244 236	230 244	236 248	
SNP	163 165 151	163 165	151 163		157 163 149	157 163	149 155	
	C-C	C-C	C-C		C-C	C-T	C-C	
D21S215	Kind/88	Mutter/88	Vater/88	mat M ni	Kind/90	Mutter/90	Vater/90	mat M ni
D21S1432	174 174 170	170 174	170 168		168 168 170	170 168	170 168	
D21S1414	143 143 139	147 143	139 139		139 143 139	139 143	139 135	
D21S1258	352 352 348	366 352	348 348		344 344 344	344 344	344 366	
D21S1445	151 151 149	149 151	149 147		149 149 151	151 149	151 149	
D21S1252	303 303 291	291 303	291 291		291 291 269	269 291	269 287	
D21S1890	236 244 248	236 244	248 236		238 238 248	238 238	248 230	
SNP	151 159 151	151 159	151 165		149 167 169	149 167		
	C-T		C-T		C-T	T-T	C-C	
D21S215	Kind/92	Mutter/92	Vater/92	mat M ni	Kind/93	Mutter/93	Vater/93	mat MI
D21S1414	170 170 168	170 170	168 170		168 174 170	168 174	170 172	
D21S1258	348 348 352	348 348	352 358		356 362 348	356 362	348 352	
D21S1445	151 151 147	147 151			141 151 149	141 151	149 147	
D21S1252	291 291 269	285 291	269 291		303 291 303	303 291	303 307	
D21S1890	248 248 230	244 248	230 244			244 244		
SNP	167 167 157	155 167	157 151		151 167 169	151 167	169 153	
	C-C	C-C	C-C		C-T	C-T	C-C	

	Kind/99	Mutter/99	Vater/99	mat M I	Kind/101	Mutter/101	Vater/101	mat M I
D21S215	168 170 174	168 170	174 170		174 172 174	174 172	174 164	
D21S1414	358 362 358	358 362	358 356		352 358 344	352 358	344 362	
D21S1258	141 151 147	141 151	147 137		147 149 151	147 149	151 147	
D21S1445	281 269 281	281 269	281 269		269 269 269	269 269		
D21S1252	230 254 230	230 254	230 248		236 246 230	236 246	230 244	
D21S1890	155 167 151	155 167	151 155		155 167 163	155 167	163 161	
SNP	C-C	C-T	C-C		C-T	C-C	C-T	
	Kind/110	Mutter/110	Vater/110	mat M I	Kind/111	Mutter/111	Vater/111	mat M II
D21S215	174 168 174	174 168	174 168		168 168 174	174 168	174 170	
D21S1414	352 356 352	352 356	352 362		348 348 356	352 348	356 362	
D21S1258	137 149 141	137 149	141 147		141 143 151	141 143	151 147	
D21S1445	269 303 269	269 303	269 269		299 299 291	303 299	291 269	
D21S1252	244 246 230	244 246	230 230		230 230 242	238 230	242 246	
D21S1890	155 155 167	169 155	167 173		161 161 151		151 157	
SNP	T-T	C-T	C-T		C-C	C-C	C-C	
	Kind/112	Mutter/112	Vater/112	mat M ni	Kind/115	Mutter/115	Vater/115	mat M ni
D21S215	170 170 170	170 170	170 174		170 170 168	170 170	168 164	
D21S1414	358 358 352		352 352		352 362 348	352 362	348 358	
D21S1258	141 151 149	141 151	149 149		141 149 151	141 149	151 143	
D21S1445	287 303 299	287 303	299 291		291 291 299	291 291	299 299	
D21S1252	230 240 242	230 240	242 236		230 238 242		242 236	
D21S1890	149 155 147	149 155	147 157		163 163 161	147 163	161 151	
SNP	C-C	C-C	C-T		C-C	C-C	C-C	
	Kind/128	Mutter/128	Vater/128	mat M I	Kind/130	Mutter/130	Vater/130	mat M II
D21S215	170 168 170	170 168	170 168		170 170 168	168 170	168 166	
D21S1432	135 135 147	131 135	147 139					
D21S1414	344 344 348	348 344	348 366		336 336 366	336 336	366 358	
D21S1258	147 147 151	147 147	151 141		151 151 137	151 151		
D21S1445	299 299 285	269 299	285 291		269 269 299	269 269	299 299	
D21S1252	230 230 230		230 230		250 250 240	246 250	240 236	
D21S1890	157 157 155	143 157	155 143		161 163 149	161 163	149 163	
SNP	C-C	C-C	C-C		C-T	C-C	C-T	
	Kind/133	Mutter/133	Vater/133	mat M II	Kind/139	Mutter/139	Vater/139	ni
D21S215	174 174 172	168 174			174 174 168	168 174	168 170	
D21S1432						139 139	139 143	
D21S1414	352 352 348	352 352	348 348					
D21S1258	141 149 143	141 149	143 149					
D21S1445	291 303 287	291 303	287 287					
D21S1252	226 244 242	226 244	242 238		155 155 155	159 155	155 163	
D21S1890	163 161	149 163						
SNP	C-C	C-C						
	Kind/143	Mutter/143	Vater/143	mat M I	Kind/144	Mutter/144	Vater/144	
D21S215	170 174 168	170 174	168 174			168 170	170 170	
D21S1414	358 348 358	358 348	358 352			352 370	352 358	
D21S1258	141 151 141	141 151				141 149	151 151	
D21S1445	269 291 269	269 291	269 143			269 291	269 269	
D21S1252	240 252 244	240 252	244 240			244 252	244 244	
D21S1890	155 159 153	155 159	153 153			155 163	155 163	
SNP	C-C	C-C	C-C			C-T	C-C	
	Kind/145	Mutter/145	Vater/145	mat M II	Kind/147	Mutter/147	Vater/147	mat M I
D21S215	170 170 168	182 170	168 174		170 174 170	170 174	170 182	
D21S1414	362 362 352	356 362	352 362		348 358 348	348 358	348 352	
D21S1258	141 151 141	141 151	141 151		151 137 141	151 137	141 141	
D21S1445	269 269 291	269 269	291 303		291 307 291	291 307	291 303	
D21S1252	246 242 230	246 242	230 230		248 244 230	248 244	230 238	
D21S1890	155 165 163	155 165	163 161		167 167 147	167 167	147 155	
SNP	C-C	C-C	C-C		C-T	C-C	C-T	

	Kind/148	Mutter/148	Vater/148	mat M I	Kind/150	Mutter/150	Vater/150	mat M I
D21S215	174 172 174	174 172	174 172		168 170 174	168 170	174 170	
D21S1414	340 358 348	340 358	348 352		352 358 362	352 358	362 344	
D21S1258	147 149 151				151 147 151	151 147	151 147	
D21S1445	303 303 303	303 303			291 299 269	291 299	269 299	
D21S1252	244 248 230	244 248	230 240		226 250 230	226 250	230 242	
D21S1890	169 169 155		155 157		161 147 161	161 147	161 147	
SNP	C-C	C-T	C-C		C-C	C-C	C-C	
	Kind/152	Mutter/152	Vater/152	mat M II	Kind/154	Mutter/154	Vater/154	mat M II
D21S215	168 168 172	174 168	172 174		168 168 168	170 168	168 174	
D21S1414	348 358 344	348 358	344 362		352 358 344	352 358	344 344	
D21S1258	147 151 137	147 151	137 141		151 147 151	151 147	151 147	
D21S1445	291 291 269	291 291	269 291		299 303 269	299 303	269 307	
D21S1252	244 246 238	244 246	238 230		230 244 248	230 244	248 244	
D21S1890	147 153 161	147 153	161 161		155 165 173	155 165	173 155	
SNP	C-C	C-C	C-C		C-C	C-C	C-C	
	Kind/155	Mutter/155	Vater/155	ni	Kind/156	Mutter/156	Vater/156	mat M I
D21S215	170 174 170	170 174	170 170		170 168 170	170 168	170 168	
D21S1432	143 143 143	143 143	143 147					
D21S1414	348 348 348	348 348	348 348		344 356 352	344 356	352 348	
D21S1258	149 141 149	149 141	149 137			149 149	141 151	
D21S1445	291 289 291	291 289	291 303		269 299 291	269 299	291 273	
D21S1252	230 230 230	230 230	230 248		240 244 236	240 244	236 230	
D21S1890	165 149 165	165 149	165 155		151 159 151	151 159	151 155	
SNP	C-C	C-T	C-T			C-T	C-T	
	Kind/157	Mutter/157	Vater/157	mat M I	Kind/158	Mutter/158	Vater/158	mat M ni
D21S215	168 170 184	168 170	184 170		168 168 170	170 168	170 168	
D21S1432					143 143 143	143 143	143 143	
D21S1414	352 366 352	352 366	352 344		362 362 344	344 362	344 352	
D21S1258	137 147 145	137 147	145 151		141 141 151	151 141	151 141	
D21S1445	269 291 273	269 291	273 303		281 281 291	291 281	291 269	
D21S1252	230 238 242	230 238	242 242		230 230 238	230 230	238 246	
D21S1890	159 163 153	159 163	153 161		163 163 155	155 163	155 141	
SNP	C-C	C-C	C-T		T-C	C-C	C-C	
	Kind/162	Mutter/162	Vater/162	mat M II	Kind/166	Mutter/166	Vater/166	ni
D21S215	168 168 168	172 168	168 170		174 174 174	174 174	174 174	
D21S1432					181 181 181	186 181	181 191	
D21S1414	344 344 344	348 344	344 344		348 348 352	358 348	352 356	
D21S1258	141 141 149	141 141	149 151		147 147 151	149 147		
D21S1445	285 303 273	285 303	273 269					
D21S1252	224 244 234	224 244			246 246 244	238 246	244 248	
D21S1890	155 143 155	155 143			151 165 167	151 165		
SNP	C-C	C-C	C-C		C-C	C-C	C-C	
	Kind/167	Mutter/167	Vater/167	mat M I	Kind/168	Mutter/168	Vater/168	mat M I
D21S215	168 174 170	168 174			168 172 174	168 172	174 168	
D21S1432					181 191 181	181 191	181 195	
D21S1414	352 358 344	352 358	344 348		348 348 348	348 348	348 352	
D21S1258			149 151		147 141 147	147 141	147 147	
D21S1445								
D21S1252	238 238 230	236 238	230 238		242 246 242	242 246	242 236	
D21S1890	147 147 167				171 167 171	171 167	171 159	
SNP	C-C	C-T	C-C		C-C	C-C	C-C	
	Kind/169	Mutter/169	Vater/169	mat M I	Kind/173	Mutter/173	Vater/173	mat M I
D21S215	168 172 168	168 172	168 168		168 174 172	168 174	172 170	
D21S1432	139 139 139	135 139	139 135					
D21S1414	344 362 352		352 348		344 356 348	344 356	348 356	
D21S1258	147 149 141	147 149	141 149		149 151 149	149 151	149 141	
D21S1445								
D21S1252	230 248 244	230 248	244 246		254 254 238	230 254	238 248	
D21S1890	163 167 149	163 167			129 129 155	149 129	155 165	
SNP	C-C	C-C	C-T		C-C	C-C	C-C	

	Kind/179	Mutter/179	Vater/179	mat M I	Kind/180	Mutter/180	Vater/180	ni
D21S215	168 170 172	168 170	172 174		174 174 174	168 174	174 174	
D21S1432					143 139 143	143 139	143 143	
D21S1414	344 344 344	354 344	344 358		352 344 352	352 344	352 344	
D21S1258	141 149 151	141 149	151 151		141 141 149		149 149	
D21S1445								
D21S1252	236 236 254	230 236	254 230		244 248 246	244 248	246 244	
D21S1890	154 154 165				151 169 161	151 169	161 151	
SNP	C-C	C-C	C-C		C-C	C-C	C-C	
	Kind/181	Mutter/181	Vater/181	mat M ni	Kind/184	Mutter/184	Vater/184	mat M ni
D21S215	168 172				172 170 172	172 170	172 170	
D21S1432	139 139 143	135 139	143 139		139 139 143	139 139	143 145	
D21S1414	348 348 344	352 348	344 358		348 358 366	348 358	366 348	
D21S1258	141 141 141	149 141	141 141		149 147 149	149 147	149 137	
D21S1445						289 309	309 269	
D21S1252	230 240 238	230 240	238 230		244 244 246	236 244	246 226	
D21S1890	151 155 159	151 155	159 165		149 149 155		155 149	
SNP	C-C	C-C	C-C		C-C	C-T	C-C	
	Kind/190	Mutter/190	Vater/190	mat M I	Kind/191	Mutter/191	Vater/191	ni
D21S215	168 170 168	168 170	168 172		170 168 170	170 168	170 170	
D21S1432	139 147 139	139 147	139 143		143 143 143	143 143	143 135	
D21S1414			348 362		348 356 348	348 356	348 348	
D21S1258	143 149 147	143 149	147 143		141 147 141	141 147	141 151	
D21S1445	309 309 237	309 309	237 303		267 291 303	267 291		
D21S1252	228 244 246				246 230 246	246 230	246 244	
D21S1890	169 155 169	169 155	169 155		151 163	151 163		
SNP	C-C	C-C	C-T		C-C	C-C		
	Kind/193	Mutter/193	Vater/193	ni	Kind/196	Mutter/196	Vater/196	ni
D21S215	170 170 168	170 170	168 170		168 168 170	168 168	170 170	
D21S1432	143 139 143	143 139	143 143		135 135 135	135 135	135 143	
D21S1414	352 348 352	352 348	352 348		348 344 348	348 344	348 344	
D21S1258	151 149 147	151 149	147 151		147 151 149	147 151	149 147	
D21S1445	291 291 267	286 291	267 299		309 267 299		299 267	
D21S1252	248 246 248	248 246	248 250		242 242 230	236 242	230 238	
D21S1890		151 159	151 165		151 163 151	151 163	151 147	
SNP	C-C	C-C	C-C			C-T	C-T	
	Kind/197	Mutter/197	Vater/197	mat M I	Kind/200	Mutter/200	Vater/200	mat M I
D21S215	168 170 174	168 170			174 182 170	174 182	170 170	
D21S1432	147 135 147	147 135	147 139					
D21S1414	344 344 348	344 344	348 362				352 362	
D21S1258	137 137 141	151 137	141 151		139 141 151	139 141	151 149	
D21S1445								
D21S1252	236 246 244	236 246	244 236		238 248 240	238 248	240 244	
D21S1890	163 165				147 147 151		151 147	
SNP		C-C	C-C		C-C	C-T	C-T	
	Kind/201	Mutter/201	Vater/201	mat M ni	Kind/202	Mutter/202	Vater/202	ni
D21S215	170 168 170	170 168	170 174		174 168 174	174 168	174 174	
D21S1432					143 143 135	143 143	135 143	
D21S1414	344 352	344 352			348 362 348	348 362	348 352	
D21S1258	141 151 147	141 151	147 147		147 149 147	147 149	147 141	
D21S1445							309 267	
D21S1252	246 248 238	246 248	238 246		230 228 246	230 228	246 230	
D21S1890	153 147 151	153 147	151 153				155 151	
SNP	C-C		C-T		C-C	C-C	C-C	
	Kind/203	Mutter/203	Vater/203	mat M I	Kind/204	Mutter/204	Vater/204	m/p ni M
D21S215	168 170 174	168 170	174 170		174 168 174	174 168	174 170	
D21S1432					139 135 143	139 135	143 139	
D21S1414	352 370 344	352 370	344 362					
D21S1258	147 149 147	147 149	147 151		149 141 149	149 141	149 141	
D21S1445		267 291	303 291		291 299			
D21S1252	230 250 248	230 250	248 250		236 230 236	236 230	236 230	
D21S1890		155 163	163 147		159 159 171	157 159		
SNP	C-C	C-C	C-C		C-C	C-C		

	Kind/205	Mutter/205	Vater/205	ni	Kind/206	Mutter/206	Vater/206	mat M ni
D21S215	168 168 168	168 174	168 170		174 174 168		168 170	
D21S1414					344 352			
D21S1258	147 147 151	147 147	151 147		151 147 149	151 147	149 141	
D21S1445								
D21S1252	236 236 236							
D21S1890		153 161	149 149		151 155 165			
SNP							C-C	
	Kind/207	Mutter/207	Vater/207	mat M I	Kind/209	Mutter/209	Vater/209	m/p ni M
D21S215	172 174 170	172 174	170 168		170 172 168	170 172	168 170	
D21S1432					143 143 143	143 143	143 143	
D21S1414	348 358 348	348 358	348 362		356 352 358	352		
D21S1258	149 151 141	149 151	141 147			149 151		
D21S1445								
D21S1252	242 244 244		244 238		244 244 236		236 248	
D21S1890	161 169						165 165	
SNP	C-C	C-C			C-C			
	Kind/210	Mutter/210	Vater/210	mat M ni	Kind/211	Mutter/211	Vater/211	ni
D21S215	174 170 174	174 170	174 170		174 174 174	174 174	174 170	
D21S1432					139 139 135	139 139	135 139	
D21S1414	358 348 358	358 348	358 348		348 352 356			
D21S1258	147 151 149	147 151	149 141		151 141 151	151 141	151 141	
D21S1445	291 299	291 299						
D21S1252	238 248 244		244 238		230 230 244	230 230		
D21S1890			155 149					
SNP	C-C		C-T			C-T		
	Kind/212	Mutter/212	Vater/212	mat M I	Kind/217	Mutter/217	Vater/217	mat M I
D21S215	170 182 170	170 182	170 170		168 172 170	168 172	170 168	
D21S1414	344 348 358							
D21S1258			147 147			147 151	147 151	
D21S1445								
D21S1252	246 248 244	246 248	244 238		246 248 230	246 248	230 238	
D21S1890		155 167						
SNP	C-C	C-C			C-T	C-T	C-T	
	Kind/218	Mutter/218	Vater/218	ni M II / mitotisch	Kind/220	Mutter/220	Vater/220	
D21S215	170 170 170	174 170	170 168		168 170 174			
D21S1432	139 139 145	143 139	145 139					
D21S1414	348 352 344	348 352	344 348		344 352 362			
D21S1258	149 141 153	149 141	153 149					
D21S1445	269 289	291 269	289 269					
D21S1252			242 240		246 248			
D21S1890						145 151	151 155	
SNP	C-C	C-C	C-C					
	Kind/221	Mutter/221	Vater/221	mat M II	Kind/225	Mutter/225	Vater/225	mat M ni
D21S215	168 168 172	174 168	172 170		168 170 168	168 170	168 168	
D21S1414	352 362 370	352 362			348 358	348 358	360 340	
D21S1258	147 147 141	151 147			151 149	151 149	151 141	
D21S1445	137 147 149	137 147	149 149		307 303 391	307 303	391 387	
D21S1252	232 242 246	232 242						
D21S1890					163 167 151	163 167		
SNP	C-C	C-C	C-C		C-C	C-C	C-C	
	Kind/227	Mutter/227	Vater/227	mat M I	Kind/229	Mutter/229	Vater/229	mat M I
D21S215	168 170 186	168 170	186 172		168 170 172	168 170	172 174	
D21S1414	344 348 358	344 348	358 352		348 352 348			
D21S1258	149 151 149	149 151	149 151		139 141 141	139 141	141 147	
D21S1445	385 391 387	385 391	387 389		269 303 291	269 303	291 291	
D21S1252	242 246 242	242 246	242 248		242 246 248	242 246	248 240	
D21S1890	163 163 171	159 163	171 161		163 159 155	163 159	155 147	
SNP	C-C	C-C	C-C		T-T	C-T	C-T	

	Kind/231	Mutter/231	Vater/231	m/p ni M I	Kind/233	Mutter/233	Vater/233	mat M ni
D21S215	170 168 174	170 168	174 170		168 170 168		168 174	
D21S1432	135 143 147	135 143	147 135					
D21S1414					362 362 362	362 362		
D21S1258	147 147 141	147 147	141 147		149 155 147	149 155	147 139	
D21S1445	291 269 291	291 269	291 281		285 287 299			
D21S1252		230 248	246 24		248 250 248	248 250	248 242	
D21S1890	169 171 167	169 171					153 159	
SNP	C-C	C-C	C-C		C-C	C-C	C-C	
	Kind/235	Mutter/235	Vater/235	mat M I	Kind/236	Mutter/236	Vater/236	m/p ni M I
D21S215	168 172 170	168 172	170 170		170 174 172	170 174		
D21S1414	348 352 362		362 352					
D21S1258	141 151 137	141 151	137 151		141 151 141	141 151	141 149	
D21S1445	291 291 291	303 291	291 291		269 299 269	269 299	269 269	
D21S1252								
D21S1890	165 165 155	165 165			149 151 171			
SNP	C-C	C-C	C-C		C-T	C-C	C-T	
	Kind/238	Mutter/238	Vater/238	mat M I	Kind/241	Mutter/241	Vater/241	mat M I
D21S215	170 172 174	170 172			168 170 174	168 170	174 168	
D21S1414	352 362 362	352 362			348 352 352		352 348	
D21S1258	141 151 149	141 151	149 149		147 145 147	147 145	147 141	
D21S1445	269 307 269	269 307	269 269		269 289 287	269 289	287 281	
D21S1252			244 248		244 244 248	236 244	248 246	
D21S1890	151 153 151	151 153	151 155		155 155 151	165 155	151 147	
SNP	C-C	C-T	C-C		C-C	C-C	C-T	
	Kind/243	Mutter/243	Vater/243	mat M ni	Kind/244	Mutter/244	Vater/244	mat M ni
D21S215	170 170 170	170 170	170 170		170 168 170	170 168	170 170	
D21S1414					352 352 362		362 352	
D21S1258	151 151 147	155 151	147 151		147 151 147	147 151	147 151	
D21S1445	291 291 303	287 291	303 299		291 291 291	291 291	291 291	
D21S1252	238 238 242	230 238	242 240		248 246 248	248 246	248 240	
D21S1890	159 155 157		157 155		157 167 151	157 167	151 147	
SNP	C-C	C-T	C-C		C-C	C-C		
	Kind/246	Mutter/246	Vater/246	m/p ni M I	Kind/251	Mutter/251	Vater/251	mat M ni
D21S215	168 170 174	168 170	174 168			168 168	168 179	
D21S1432	139 135 143	139 135	143 139					
D21S1414	352 356 356	352 356			348 348 344	348 348	344 344	
D21S1258	147 149 151	147 149	151 147		141 149 147	141 149	147 149	
D21S1445	291 291 303	291 291	303 291		287 303 287		287 303	
D21S1252	230 234 234	230 234			230 238 248	230 238	248 248	
D21S1890		149 153	145 149		171 151 147	171 151	147 149	
SNP	C-C	C-C	C-C		C-C	C-C	C-C	
	Kind/264	Mutter/264	Vater/264	mat M I	Kind/266	Mutter/266	Vater/266	mat M I
D21S215	170 166 170	170 166	170 168		170 174 168	170 174	168 170	
D21S1432	149 151 139	149 151	139 143					
D21S1414	352 358 352	352 358	352 356		348 366 344	348 366	344 340	
D21S1258	149 151 143	149 151	143 149		149 147 149	149 147	149 153	
D21S1445	269 269 291	269 269	291 269		269 291 303	269 291	303 303	
D21S1252	230 238 236	230 238	236 230		230 230 230	230 230	230 238	
D21S1890		155 155	149 155		155 167 151	155 167	151 155	
SNP	C-C	C-C	C-C		C-C	C-C	C-C	
	Kind/N1	Mutter/N1	Vater/N1	ni	Kind/N3	Mutter/N3	Vater/N3	m/p ni M I
D21S215		168 174	170 174		172 174 170	172 174	170 172	
D21S1432	139 139 139	139 139	139 139		143 147 139	143 147	139 143	
D21S1414	362 344 348	362 344	348 362		344 352 348	344 352	348 344	
D21S1258		151 137	147 153		151 149 151	151 149	151 153	
D21S1445		269 291	291 299		269 303 283	269 303	283 269	
D21S1252	230 230 230	230 230	230 230		250 230 250	250 230	250 230	
D21S1890	155 155 159	155 155			163 165 171			
SNP	C-C	C-C	C-C		C-C	C-C	C-C	

	Kind/N4	Mutter/N4	Vater/N4	mat M I
D21S215	166 172 174	166 172	174 172	
D21S1432	139 139 143	139 139	143 143	
D21S1414	352 348 352	352 348	352 348	
D21S1258	151 141 151	151 141	151 138	
D21S1445	269 269 269	269 269	269 269	
D21S1252			230 238	
D21S1890	167 167 149	153 167	149 169	
SNP	C-C	C-C	C-C	

	Kind A /149	KindB /149	Mutter/149
D21S215	172 174 170	172 174 170	172 174
D21S1414	344 362	344 362 348	344 362
D21S1258	147 151 149	151 151 149	147 151
D21S1445	269 307 291	307 307 303	269 307
D21S1252	246 230	230 230 238	246 230
D21S1890	151 167 139	151 167 139	151 167
SNP	C-C	C-C	C-C

	Kind/163+	Kind/163	Mutter/163	Vater/163	mat M II
D21S215	168 168 174		182 168	174 170	
D21S1414	356 356 352	356 356 352	350 356	352 352	
D21S1258	141 141 141	141 141 141	147 141	141 149	
D21S1445					
D21S1252	242 242 244	242 242 244	230 242	244 246	
D21S1890				155 155	
SNP	C-C	C-C	C-C	C-C	

	Kind A /170	Kind/ B 170	Mutter/170	Vater/170	mat MII
D21S215	168 168	168 168 168	170 168	168 172	
D21S1414		352 352 348	340 352	348 344	
D21S1258	141 141 151	141 149	141 141	149 151	
D21S1445	239 303				
D21S1252	248 248	248 248 246	246 248		
D21S1890			155 171	153 153	
SNP		C-C	C-T	C-C	

DISKUSSION

1.19 ELTERLICHES ALTER ZUM ZEITPUNKT DER GEBURT DES DOWN SYNDROM KINDES

Das mütterliche Alter ist einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Geburt eines Kindes mit Trisomie 21. Dies trifft auch für die Daten zu, die im Oman erhoben wurden. Die Abbildung 7 belegt eine deutliche Korrelation der Geburt eines Kindes mit Trisomie 21 mit erhöhtem maternalen Alter (Median 34 Jahre) und der Geburtenfolge. Die relativ homogene paternale Altersverteilung in Abbildung 8 weist auf keinen besonderen Alterseffekt hin, der wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle in der Entstehung des Down Syndroms hätte [Kazaura und Lie, 2002]. Außerdem ist der geringe paternale Effekt sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass mütterliches und väterliches Alter der Paare in der Regel nicht weit auseinander liegen

1.20 GESCHLECHTERVERHÄLTNISSE

Die Analyse des Geschlechterverhältnisses Jungen:Mädchen bei Kindern mit DS im Oman zeigt, dass es mit 1,37:1 (N=242) deutlich zugunsten der Jungen verschoben war. Bei den gesunden Geschwistern der Down Syndrom Kinder lag das Verhältnis Jungen:Mädchen bei 1,09:1 (N=2001). Eine noch stärkere Verschiebung zugunsten der Jungen ergab sich für die Teilstudie der molekulargenetisch untersuchten Down Syndrom Kinder mit 1,65:1, wobei auch bei deren gesunden Geschwistern ein verschobenes Verhältnis von 1,27:1 zugunsten der Jungen vorlag. Für diese letzte Beobachtung haben wir keine Interpretation.

Die Verschiebung des Geschlechterverhältnisses bei der Trisomie 21 wurde bereits in anderen epidemiologischen Down Syndrom Studien beschrieben [Bernheim et al. 1979], [Nielsen et al. 1981], [Mikkelsen et al. 1990]. Es sind unterschiedliche Hypothesen als Erklärung für die Verschiebung des Geschlechterverhältnisses beim Down Syndrom herangezogen worden. Eine der Hypothesen geht von einer höheren intrauterinen Letalität weiblicher Feten aus. Durch die Untersuchungen von [Huether 1996], die die Geschlechterverhältnisse von Feten vor der 16. SSW, nach der 16.SSW. und bei Lebendgeborenen vergleichen, ergeben sich keine Hinweise auf einen derartigen Selektionsfaktor.

Andere Studien gehen davon aus, dass der Überschuss der Jungen beim Down Syndrom insbesondere durch paternal bedingtes Non-disjunction zustande kommt. Hier werden zwei Mechanismen diskutiert: Zum einen eine reduzierte paternale Rekombination im Chromosom 21, zum anderen eine Segregation der beiden paternalen Chromosomen 21 präferentiell mit dem Y-Chromosom. In diesem Zusammenhang ist eine Studie interessant, die zeigt, dass in den Spermien gesunder Spender von den 113 für Chromosom 21 disomen Spermien 69 ein Y-Chromosom und nur 44 ein X-Chromosom trugen [Griffin et al. 1996].

Für die hier vorliegende Oman-Studie ergibt sich für die Verschiebung des Geschlechterverhältnisses keinen Anhaltspunkt, dass der Überschuss an Jungen durch paternales Non-disjunction zustande gekommen ist, weil alle DS-Fälle auf maternales Non-disjunction zurückgehen. Somit kann auch diese Studie zur Erklärung des Phänomens, das bisher in allen epidemiologischen Untersuchungen beim Down Syndrom beschrieben wurde, nicht beitragen.

1.21 PARENTALER UND MEIOTISCHER URSPRUNG DES ZUSÄTZLICHEN CHROMOSOMS 21

In dieser Studie fanden sich 51 % maternale M I und 14% maternale M II - Fehlverteilungen. Betrachtet man diese 72 voll informativen maternalen Meiosen, so ergibt sich ein Verhältnis von Meiose I zu Meiose II von 80:20. Dieses Verhältnis korreliert gut mit anderen Studien, die in Tabelle 18 zusammengefasst sind. Bei der maternalen Fehlverteilung zeigt sich in etwa ein Verhältnis von Meiose I zu Meiose II von 3:1 [Antanorakis et al. 1993], [Mikkelsen et al. 1995], [Yoon et al. 1996]. Die nicht informativen Meiosen (19%) eindeutig maternaler Herkunft, und die 14% nicht informativen Meiosen spiegeln wahrscheinlich die sehr hohe Konsanguinität wieder, da die Eltern häufig in vielen Allelen übereinstimmten. Im ersteren Fall konnten dadurch keine Angaben über die Fehlverteilung gemacht werden und im letzteren war zusätzlich die elterliche Herkunft des überzähligen Chromosoms 21 nicht ermittelbar. In den zwei Fällen, bei denen es sich sowohl um mitotischen Ursprungs als auch um eine Meiose 2 handeln könnte, ermöglichte die Allelkonstellation der Eltern ebenfalls keine eindeutige Aussage.

Als besonders bemerkenswert stellt sich das Resultat heraus, dass bei allen 93 parental informativen Meiosen in keinem Fall ein paternales Non-disjunction nachgewiesen wurde. Im Gegensatz dazu zeigen alle übrigen Studien das Auftreten des paternalen Non-disjunction zwischen 8 % und 20 % [Antanorakis et al. 1993], [Lamb et al. 1996], [Savage et al. 1998], [Yoon et al. 1996], [Jyothy et al. 2000].

Tab. 17: Ursprung der Non-disjunction in der Trisomie 21

Quelle	Ursprung und Anzahl der Fälle (%)			
Vorliegende Studie	Maternal 93 (100%)		Paternal 0	
	M I	57 (51%)	M I	0
	M II	15 (14%)	M II	0
	Mitotisch /Meiose2	2 (2%)	Mitotisch	0
Antanorakis et al. 1993, Lamb et al. 1996	Maternal 805 (91.5%)		Paternal 75 (8.5%)	
	M I	556 (68.9%)	M I	17 (2.1%)
	M II	176 (21.8%)	M II	27 (3.3%)
	Mitotisch	17 (2.1%)	Mitotisch	14 (1.7%)
Yoon et al. 1996	Maternal 146 (86%)		Paternal 16 (9%)	
	M I	109 (75%)	M I	8 (50%)
	M II	36 (25%)	M II	8 (50%)
			Mitotisch 8 (5%)	
Savage et al. 1998	Maternal 546 (90%)		Paternal 60 (10%)	
	M I	398 (65%)	M I	22 (4%)
	M II	137 (23%)	M II	28 (5%)
	Mitotisch	11 (2%)	Mitotisch	10 (2%)
Jyothy et al. 2000	Maternal 793 (79.24%)		Paternal 208 (20.76%)	

Allein auf Grund der Fallzahl lässt sich dieses Phänomen nicht erklären, da selbst bei Annahme der niedrigsten publizierten Häufigkeit von 8% bei 93 informativen Meiosen 7-8 und bei der höchsten publizierten Häufigkeit von 20% 18-19 paternale Non-disjunction zu erwarten gewesen wären. Damit unterscheiden sich die hier vorliegenden Daten signifikant von den publizierten epidemiologischen Studien zur parentalen Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 21. Derzeit haben wir keine Erklärung für dieses Resultat. Es ist aber vorgesehen, die Fälle von Down Syndrom im Oman von 2000 bis heute komplett zu erfassen, um den Befund an größeren Fallzahlen bestätigen oder widerlegen zu können.

1.22 CROSSING-OVER-HÄUFIGKEITEN

Die Assoziation zwischen mütterlichem Alter und meiotischer Rekombination wurde analog zu der Studie von [Lamb et al. 2005] durchgeführt. Die Trisomie 21 Fälle, in denen eine M I Fehlverteilung auftrat, wurden drei mütterlichen Altersgruppen zugeordnet und die Anzahl der Crossing-over pro Region gezählt.

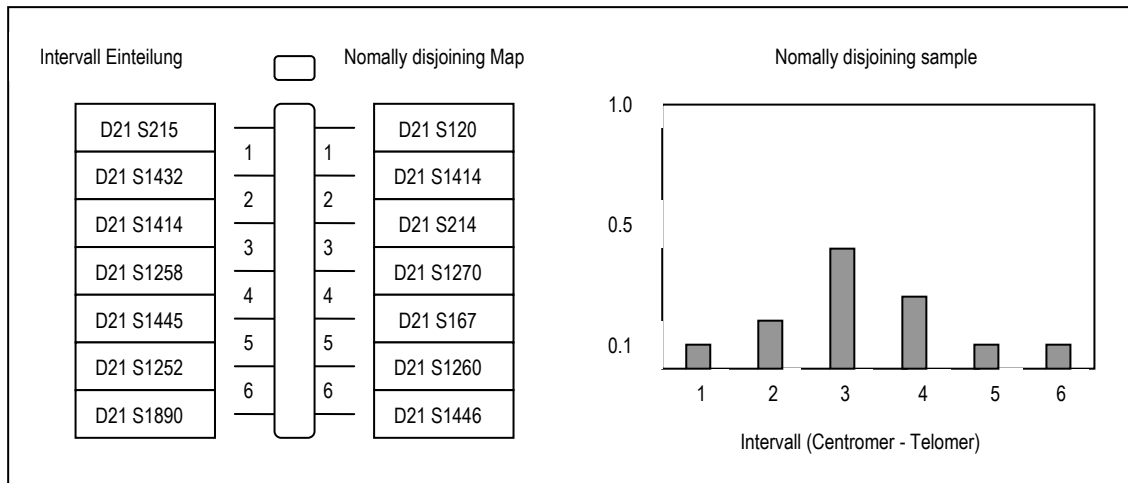


Abb. 20: Schematische Darstellung der Intervalleinteilung des Chromosoms 21 zur Auszählung meiotischer Rekombination und rechts im Diagramm Einzel-Austauschhäufigkeiten der Kontrollgruppe (Normally disjoining samples) in %

Dabei fällt auf, dass sich die Crossing-over bei Frauen, die jünger als 35 Jahre alt sind, auf die perizentromeren und telomeren Intervalle 1, 2 und 6 beschränken, während bei Frauen über 36 Jahren Crossing-over Ereignisse auch in den mittleren Intervallen 3 und 4 auftreten. Die Verteilung der Austausche bei älteren Frauen ist vergleichbar mit der Verteilung der Austausche in der Kontrollgruppe, d.h. von Frauen, bei denen eine normale Trennung der beiden Chromosomen 21 stattgefunden hat.

Auch in der Oman-Studie zeigen ältere Frauen eine Verteilung, die mit der der Kontrollgruppe von [Lamb et al. 2005] vergleichbar ist. [Lamb et al. 2005] diskutieren in diesem Zusammenhang, dass sich während des Alterns der Frau umwelt- und altersabhängige Faktoren im Ovar akkumulieren. Diese führen dann zur Fehlverteilung der Oozyten mit normal verteilten Austauschmustern welche, beruhend auf rekombinations-unabhängigen Faktoren, am deutlichsten durch steigendes Alter beeinflusst sein könnte. Dieser beobachtete maternale Alterseffekt in der Altersgruppe der älteren Mütter wird von unseren Ergebnissen bestätigt.

Für die jungen Frauen ergibt sich, wie in der Studie von [Lamb et al. 2005], eine Häufung der Austausche in der telomernahen Region. Allerdings ist in der vorliegenden Untersuchung auch eine Häufung in der centromernahen Region zu beobachten. [Lamb et al. 2005] diskutieren in diesem Zusammenhang, dass bei jüngeren Frauen prädisponierende Austausche speziell in den telomeren Regionen auftreten und dass dies der größte Risikofaktor für Non-disjunction und somit für Trisomie 21 bei jungen Frauen ist.

1.23 AUSWERTUNG DES MTHFR-POLYMORPHISMUS

Einige Autoren haben den MTHFR-Polymorphismus beim Vorliegen der maternalen Konstellation CT bzw. TT im Zusammenhang mit erhöhtem maternalen Risiko für das Down Syndrom beschrieben [Hobbs et al 2000], [James et al. 1999]. Ein Erklärungsmodell postuliert einen möglichen Überlebensvorteil der Kinder mit Down Syndrom durch die Überexpression des T-Allels [Hobbs et al 2002]. In anderen Publikationen konnte keine Beziehung zwischen Down Syndrom und MTHFR-Polymorphismus bei italienischen [Stuppia et al. 2002], amerikanischen [Yanamandra et al. 2003] und türkischen [Boduroglu et al. 2004] Populationen nachgewiesen werden (Tabelle 18). Die widersprüchlichen Ergebnisse lassen vermuten, dass es möglicherweise geographische Variabilität bei den Allelhäufigkeiten des Polymorphismus gibt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Polymorphismus bei 83 Familien untersucht. Die erhobenen Daten aus dem Oman zeigen, dass das C-Allel mit 87% im Oman deutlich häufiger ist als in den anderen untersuchten Populationen.

Tab. 18: MTHFR-Genotyp der Müttern in verschiedenen Studien

Studie	CC %	CT %	TT %	CT+TT %
[James et al. 1999]				
	DS-Mütter (n-64)			
	26.3	59.6	14	73.6
	Kontrollen (n-112)			
	48	44	8	52
[Hobbs et al 2000]				
	DS-Mütter (n-64)			
	32	54	14	68
	Kontrollen (n-112)			
	48	42	10	52
[Stuppia et al. 2002]				
	DS-Mütter (n-64)			
	31	50.7	18.3	69
	Kontrollen (n-112)			
	24.1	55.4	20.5	75.9
[Boduroglu et al. 2004]				
	DS-Mütter (n-152)			
	56.6	36.2	7.2	43.4
	Kontrollen (n-91)			
	63.7	33.0	3.3	36.3

Die Analyse der Segregation in den informativen Familien ergab im Gegensatz zu den Daten von Hobbs, dass in den untersuchten omanischen Familien das C-Allel, und nicht das T-Allel präferentiell an die Kinder mit Down Syndrom weitergegeben wird. Dies gilt sowohl für die Transmission der paternalen und maternalen Allele (Tab.19).

Tab. 19: Vererbung des MTHFR 677 Allels von heterozygoten Eltern an das Down Syndrom Kind

* Eine Familie wurde nicht mitgezählt, weil alle drei Familienmitglieder heterozygot waren, und die elterliche Herkunft des Allels nicht ermittelt werden konnte.

Maternale Allele*		Paternale Allele*		Gesamt	
T	C	T	C	T	C
Vererbt(erwartet)	Vererbt(erwartet)	Vererbt(erwartet)	Vererbt(erwartet)	Vererbt(erwartet)	Vererbt(erwartet)
5 (E=9)	13 (E=9)	6 (E=8,5)	11 (E=8,5)	12 (E=18,5)	25 (E=18,5)
$\chi^2 = 3.55$		$\chi^2 = 1.47$		$\chi^2 = 4.56$	

Bei Verwendung des Chi-Quadrat-Tests in Tabelle 19 mit einem Freiheitsgrad ergibt sich bei den maternalen und paternalen Allelen jeweils ein Wert der nicht größer als 3.84 ist. Somit ist das Ergebnis vom Ausmaß her nicht signifikant, zeigt aber bei den omanischen Familien gegensätzliche Allel-Präferenzen im Vergleich zu [Hobbs et al 2000]. Das Gesamtergebnis ist mit 4.56 deutlich signifikant auf einem 5% Niveau. Somit bestätigen sich die Beobachtungen aus den Tabellen 15 und 16.

1.24 AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE DER SINGULÄREN KONSANGUINEN FAMILIE

Bemerkenswert ist, dass in den Zweigen der Familie, in denen die Mütter Trägerinnen der Translokation sind, 7 der 11 Kinder (das Zwillingsspaar wurde als 1 gewertet, weil es sich um eineiige Zwillinge handelt), d.h. 64% ein DS aufwiesen. Die Angaben in der Literatur gehen für den Fall, dass die Frau Trägerin einer 14;21 Translokation ist, von einer Wahrscheinlichkeit einer Translokations-Trisomie von 10% bei den Lebendgeborenen aus [Ferguson-Smith 1983], [Boue and Gallano 1984], [Stene and Stengel-Rutkowski 1982], [Daniel et al. 1989]. Deutlich geringer ist die Wahrscheinlichkeit einer Translokations-Trisomie bei den Nachkommen von männlichen Trägern mit ca. 1%.

In drei weiteren Familien mit singulären Down-Fällen wurde derselbe Haplotyp für Chromosom 21 wie in dieser Familie gefunden, hier folgt die Untersuchung des Chromosoms 14. Sollte sich auch hier derselbe Haplotyp bestätigen, wäre diese Information besonders wichtig für die genetische Beratung bislang noch nicht geschlechtsreifer Familienmitglieder. Für diese Familien, die dann möglicherweise ebenfalls Träger des Translokations-Chromosoms sein könnten, was durch eine Chromosomenanalyse zu bestätigen wäre, müsste etwa ein Risiko von 50% angenommen werden, ein Kind mit Down Syndrom zu bekommen. Weil die Non-disjunction in der untersuchten Familie ein höheres Risiko, der Geburt eines DS-Kindes annehmen lässt, liegt dieser Wert deutlich über den Literaturangaben.

1.25 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

In der geographisch weit umfassenden Region des Vorderen und Mittleren Orients, in deren Zentrum die Arabische Halbinsel liegt, finden sich seit der Historie immer wieder zahlreiche Konfliktherde. Allein die Gesamtzahl der im Zeitraum von 1945 bis 1997 im Vorderen und Mittleren Orient geführten Kriege beläuft sich auf 42, was einem Anteil von rund 20 Prozent am

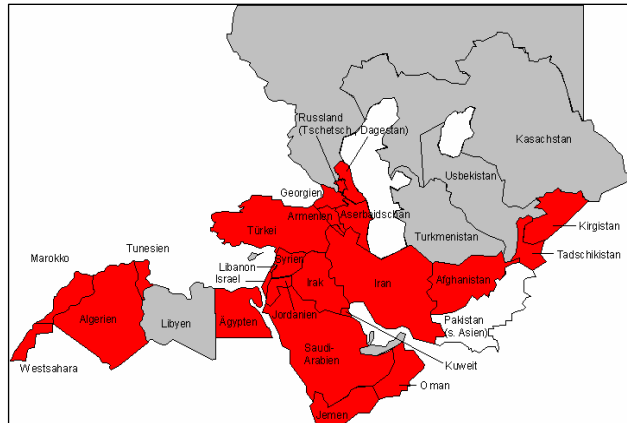


Abb. 27: Kriege und bewaffnete Konflikte in vorderen und mittleren Orient

Weltkriegsgeschehen in diesem Zeitraum entspricht. Ein Phänomen, das sich anhand der spezifischen Rolle des Palästina-Konflikts sowie der Verflechtung regionaler Konflikte mit internationalen Interessen erklären lässt.

Eine weitere wichtige Ursache für diese Instabilität ist das Erdölvorkommen. Im Irak, Iran und in den sechs Staaten des Golfkooperationsrates (Saudi-Arabien, Bahrain, Vereinigte Arabische Emirate, Kuwait, Katar und Oman) finden sich zwei Drittel der bekannten Erdölvorkommen. Der Welterdölmarkt wird zu 30% von diesen Ländern beliefert. Ein großer Teil des Öls muss auf seinem Weg nach Japan und in die westlichen Industrienationen die vom Oman kontrollierte Straße von Hormus passieren.

Zu den aktuellen Konfliktschwerpunkten in der Nachbarschaft des Omans zählt der Erste Golfkrieg zwischen Irak und Iran (1980-1988), der Überfall Iraks auf Kuwait im Jahr 1990 und dem darauf folgenden Zweiten Golfkrieg 1991, sowie die am 20. März 2003 begonnene so genannte Operation "Iraq Freedom", welche in der Öffentlichkeit als Dritter Golfkrieg wahrgenommen wurde.

Allein diese kurze Darstellung bietet bereits eine Vielzahl von denkbaren regionalen Einflussfaktoren auf das Erbgut. Mögliches Schädigungspotential für das menschliche Genom geht durch Verwendung biologischer, chemischer und/oder radioaktiver Waffen in den genannten Kriegen aus. Letzteres ist unter Berücksichtigung der Vorarbeiten von Prof. Sperling zu dem Tschernobyl-Fallout, die einen Einfluss von Radioaktivität auf die Prävalenz des Down Syndroms in Berlin zeigen konnten, besonders interessant.

Dass die Ergebnisse des MTHFR-Polymorphismus', anders als in den veröffentlichten Studien das C-Allel viel häufiger aufwiesen, spricht für ganz andere Selektionsbedingungen auf der arabischen Halbinsel, als in bisher untersuchten Regionen. Erstaunlich ist auch das völlige fehlen paternalen Non-disjunction, die mittels größerer Fallzahlen widerlegt oder bestätigt werden sollte.

Ein heterogenes Ursachengeflecht bestehend aus geographischen, kulturellen, genetischen Besonderheiten und Umweltfaktoren lässt an dieser Stelle keine kausalen Folgerungen zu. Aber die teilweise erstaunlichen Ergebnisse dieser Pilotstudie werden zu einem weiteren Antrag führen. Geplant ist eine vollständige Erfassung aller Kinder mit Down Syndrom vom Jahr 2000 bis heute, um einen repräsentativen Populationsbezug zur Omanischen Bevölkerung herstellen zu können.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Down Syndrom trägt wesentlich zur Morbidität und Mortalität im Kindesalter bei und ist die häufigste Ursache geistiger Behinderung bei Neugeborenen. Überwiegend handelt es sich um Neumutationen mütterlichen Ursprungs. Die hohe Rate an Neumutationen und deren starke Zunahme mit dem mütterlichen Alter sprechen dafür, dass die Chromosomensegregation in der Oogenese ein sehr fehleranfälliger Prozess ist.

Im Rahmen dieser Pilotstudie konnte eine deutliche Alterskorrelation zwischen dem Auftreten der Geburt eines Down Syndrom Kindes und dem elterlichen Alter beobachtet werden. Der Median des mütterlichen Alters zu diesem Zeitpunkt betrug 34 und der des Vaters 41 Jahre. In der Geschwisterfolge wurde das Down Syndrom Kind durchschnittlich als 8,5tes Kind geboren.

Wie in anderen publizierten Studien wurde in der vorliegenden Studie gezeigt, dass das Geschlechterverhältnis bei den Down Syndrom Kindern deutlich zugunsten der Jungen verschoben ist. Bei den 242 Down Syndrom Kindern aus der Gesamtstudie ergab sich ein Geschlechterverhältnis von 1,37:1 in Vergleich zu 1,09:1 bei deren 2001 gesunden Geschwistern.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der molekulargenetischen Analyse der elterlichen Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 21, der Verteilung der Cross-over, und der Analyse des MTHFR-Polymorphismus. In dieser Studie fanden sich 51 % maternale Meiose I und 14% maternale Meiose II – Fehlverteilungen, weitere 19% der untersuchten Meiosen konnten eindeutig auf maternale Herkunft zurückgeführt werden, die Meiose war indes nicht informativ. In 2 Fällen könnte es sich sowohl um mitotischen Ursprung oder einen Meiose II Fehler handeln. Die restlichen 14% der Meiosen waren nicht informativ. Betrachtet man die 72 voll informativen maternalen Meiosen, so ergibt sich ein Verhältnis von Meiose I zu Meiose II von 80:20. Dieses Verhältnis korreliert mit anderen Studien zur parentalen Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 21.

Bemerkenswerter Weise fanden sich unter den 93 Meiosen, die bezüglich der Paternität informativ waren, kein paternales Non-disjunction Ereignis. Selbst bei Annahme der niedrigsten publizierten Häufigkeiten von 8%, wären auf Grund der Fallzahl von 93 informativen Meiosen, 7-8 paternale Non-disjunction zu erwarten gewesen. Damit unterscheiden sich die hier vorliegenden Daten von den publizierten epidemiologischen Studien zur parentalen Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 21, wofür derzeit keine Erklärung existiert.

Die Assoziation zwischen mütterlichem Alter und meiotischer Rekombination wurde analog zu der Studie von [Lamb et al. 2005] durchgeführt. Für die jungen Frauen ergibt sich eine Häufung der Austausche in der telomernahen Region. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei älteren Frauen eine Verteilung, die mit der der Kontrollgruppe vergleichbar ist. Somit konnten die Beobachtungen dieser aktuellen Studie bestätigt werden.

Da der MTHFR-Polymorphismus beim Vorliegen der maternalen Konstellation CT bzw. TT in Zusammenhang mit erhöhtem maternalen Risiko für das Down Syndrom beschrieben wurde, wurde dieser bei 83 Familien im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die erhobenen Daten aus dem Oman zeigen, dass das C-Allel mit 87% im Oman deutlich häufiger ist als in den anderen untersuchten Populationen. Die Analyse der Segregation in den informativen Familien ergab im Gegensatz zu anderen Publikationen, dass in den untersuchten omanischen Familien das C-Allel, und nicht das T-Allel präferentiell an die Kinder mit Down Syndrom weitergegeben wurde. Dies gilt sowohl für die Transmission der paternalen und maternalen Allele. Dieses Ergebnis spricht für eine große geographische Variabilität des Polymorphismus und dafür, dass möglicherweise besondere Selektionsbedingungen auf der arabischen Halbinsel vorliegen.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adinolfi M, Sherlock J, Soothill P, Rodeck C. Molecular Evidence of Fetal-Derived Chromosome 21 Markers (STRs). *Prenat Diagn* 1995;15(1):35-39.
- Alfi OS, Chang R, Azen SP. Evidence for genetic control of nondisjunction in man. *Am J Hum Genet* 1989; 32:477-483
- Antonarakis SE, Down Syndrome Collaborative Group. Parental origin of the extra chromosome in Trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. *N Engl J Med* 1991; 324:872-876
- Antonarakis SE, Avramopoulos D, Blouin JL, Talbot CC Jr, Schinzel AA. Mitotic errors in somatic cells cause trisomy 21 in about 4.5% of cases and are not associated with advanced maternal age. *Nat Genet* 1993 Feb 3; (2):1:46-50
- Aula P, Leisti J, von Koskull H. Partial Trisomy 21. *Clin Genet* 1973; 4:241-251
- Bernheim A, Chastang CI, de Heaulme M and de Grouchy J, Exces de garçons dans la trisomie 21. *Ann Genet* 1979; 22:112-114
- Boduroglu K, Alanay Y, Koldan B, Tuncbilek E, Methylenetetrahydrofolate reductase enzyme polymorphisms as maternal risk for Down syndrome among Turkish women. *Am J Med Genet A* 2004 May 15; 127(1):5-10
- Boue A, Gallano P. A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1356 prenatal diagnoses. *Prenat Diagn* 1984; *Spring4 Spec No*:45-67
- Bowen DJ, Bowley S, John, M. Factor V Leiden (G1691A), the Protrombin 3'-Untranslated Region Variant (G20210A) and Thermolabile Methylenetetrahydrofolat Reductase (C677): A single Genetic Test Genotypes all three Loci - Dermination of Frequencies in the S.Wales Population of the UK. *Thromb Haemost* 1998;79:949-954
- Brugge KL, Nichos MD, Salmon DP, Hill LR, Delis DC, Aaron L, Trauner DA. Congenitive impairment in adults with Down's syndrome: similarities to early cognitive changes in Alzheimer disease. *Neurology* 1994;44 :232-240

- Bruyère H, Rupps R, Kuchinka BD, Friedman JM, Robinson WP. Recurrent trisomy 21 in a couple with a child presenting trisomy 21 mosaicism and maternal uniparental disomy for chromosome 21 in the euploid cell line. *Am J Med Genet* 2000;94:35-41
- Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JKV, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 1998; 392:300-303
- Cantu JM, Hernandez A, Plascencia L, Vaca G, Moller M, Rivera M. Partial Trisomy and monosomy 21 in an infant with an unusual de novo 21/21 translocation. *Ann Génét* 1980;23:183-186
- Clarke CM, Edwards JH, Small peice V. 21-Trisomy/Normal Mosaicism in an Intelligent Child with some Mongoloid Characters. *Lancet* 1961;l:1028-1030
- Cozzi J, Conn CM, Harper J, Winston RML, Rindl M, Farndon PA, Delanty JDA. A trisomic germ cell line and precocious chromatid segregation leads to recurrent trisomy 21 conception. *Hum Genet* 1999;104:23-28
- Czeizel AE, Elek C, Gundy S, Métneki J, Nemes E, Reis A, Sperling K, Tímár L, Tusnády G, Virágh Z. Environmental trichlorfon and cluster of congenital abnormalities. *Lancet* 1993; 341:539-542
- Daniel A, Hook EB, Wulf G. Risks of unbalanced progeny at amniocentesis to carriers of chromosome rearrangements: data from United States and Canadian laboratories. *Am J Med Genet* 1989 May; 33(1):14-53
- Down, JM. Observation on an ethnic classification of idiots. *Clin. Lecture Reports* 1866; 3:259-262
- Eichenlaub-Ritter U. Genetics of oocyte Ageing. *Maturitas* 1998; 30:143-169
- Ferguson-Smith MA. Prenatal chromosome analysis and its impact on the birth incidence of chromosome disorders. *Br Med Bull* 1983; Oct 39(4):3:55-64
- Giraud F and Mattei JF. Epidemiological aspects of trisomy 21. *J Genet Hum* 1975; 23:1-30
- Griffin D, Abruzzo M, Millie E, Feingold E and Hassold T. Sex ratio in normal and disomic sperm: evidence that the extra chromosome 21 preferentially segregates with the Y chromosome.

- Am. J. Hum. Genet 1996; 59:1108–1113
- Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, Saker D, et al. Human aneuploidie: incidence, origin, and ethiology. Environ Mol Mutagen 1996; 28:167
- Hassold T, Sherman S. Down syndrome: genetic recombination and the origin of the extra chromosome 21. Hum Genet 2000; 57:95-100
- Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human Aneuploidie. Nature 2001; 2:280-291
- Hassold TJ. The incidence and origin of human trisomies. In: Hassold TJ, Patterson D, eds. Down Syndrome. Apromising future, together. New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-Liss, John Wiley & Sons, Inc., 1999:67-74
- Hassold TJ and Jacobs PA. Trisomy in man. Annu. Rev. Genet. 1984; 18:69-97
- Hassold T, Quillen SD and Yamane JA. Sex ratio in spontaneous abortions. Ann Hum Genet 1983; 47:39–47
- Haugen OH, Hovding G, Riise R. Ocular changes in Down syndrome. Tidsskr Nor Laegeforen 2004 Jan 22; 124(2):186-8
- Haviv YS, Shpichinetsky V, Goldschmidt N, Atta IA, Ben-Yehuda A, Friedman G. The common mutations C677T and A1298C in the human methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease in hemodialysis patients. Nephron 2002 Sep 9; 2(1):120-6
- High Background Radiation Reserch Group. Health survey in high background radiation areas in China. Science 1980; 209:877-880
- Hitzler JK, Zipursky A. Origins of leukaemia in children with Down syndrome. Nat Rev Cancer 2005 Jan 5; (1):11-20
- Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, Pogribna M, Rozen R, James SJ. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. Am J Hum Genet 2000 Sep; 67(3)6:23-30

- Hobbs CA, Cleves MA, Lauer RM, Burns TL, James SJ. Preferential transmission of the MTHFR 677 T allele to infants with Down syndrome: implications for a survival advantage. *Am J Med Genet* 2002 Nov 15; 113(1):9-14
- Huether CA, Martin RL, Stoppelman SM, D'Souza S, Bishop JK, Torfs CP, Lorey F, May KM, Hanna JS, Baird PA, Kelly JC. Sex ratios in fetuses and liveborn infants with autosomal aneuploidy. *Am J Med Genet* 1996 Jun 14; 63(3):492-500
- Hug E. Das Geschlechtsverhältnis beim Mongolismus. *Ann Paediatr* 1951; 177:31-54
- Jackson JF, North III ER, Thomas JG. Clinical diagnosis of Down's Syndrome. *Clin Genet* 1976; 9:483-487
- James RS, Ellis K, Pettay D, Jacobs PA. Cytogenetic and molecular study of four couples with multiple trisomy 21 pregnancies. *Eu J Hum Genet* 1998; 7 :207-212
- James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, Yi P, Tafoya DL, Swenson DH, Wilson VL, Gaylor DW. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 1999 Oct ; 70(4):495-501
- Jyothy A, Kumar KS, Rao GN, Rao VB, Swarna M, Devi BU, Sujatha M, Kumari CK, Reddy PP. Cytogenetic studies of 1001 Down syndrome cases from Andhra Pradesh, India. *Indian J Med Res* 2000 Apr ;111:133-7
- Kazaura MR, Lie RT. Down's syndrome and paternal age in Norway. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2002 Oct ;16(4):314-9
- Kochupupillai N, Verma IC, Grewal MS, Remalinggaswami V. Down's syndrome and related abnormalities in an area of high background radiation in coastal Kerala. *Nature* 262 1976:60-61
- Koehler KE, Hassold TJ. Human aneuploidy: lessons from achiasmatic segregation in *Drosophila melanogaster*. *Ann Hum Genet* 1998;62:457-479
- Lamb NE, Freeman SB, Savage-Austin A, Pettay D, Taft L, Hersey J, Gu Y, Shen J, Saker D, May KM, Avramopoulos D, Petersen MB, Hallberg A, Mikkelsen M, Hassold TJ, Sherman SL. Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to Non-

- disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat Genet* 1996 Dec;14(4) :400-5
- Lamb NE, Feingold E, Savage A, Avramopoulos D, Freeman S, Gu Y, Hallberg A, Hersey J, Karadima G, Pettay D, Saker D, Shen J, Taft L, Mikkelsen M, Petersen MB, Hassold T, Sherman SL. Characterisation of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal Non-disjunction of chromosome 21. *Hum Mol Genet* 1997;6 :1391-1399
- Lamb NE, Yu K, Shaffer J, Feingold E, Sherman SL. Association between maternal age and meiotic recombination for trisomy 21. *Am J Hum Genet* 2005 Jan; 76(1):91-9
- Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Etude des chromosomes somatique de neuf enfants mongoliens. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.*(1959 a);248:1721-1722
- Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Les chromosomes humains en culture de tissue. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.*(1959 b);248:602-603
- LeMaire-Adkins R, Radke K, Hunt PA. Lack of checkpoint control at a metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. *J Cell Biol* 1997;7 :1611-1619
- Levy J. The gastrointestinal tract in Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* 1991;373:245-56
- Marino B. Congenital heart disease in patients with Down's syndrome: anatomic and genetic aspects. *Biomed Pharmacother* 1993;47(5):197-200
- Matsuura S, Ito E, Tauchi H, Komatsu K, Ikeuchi T, Kajii T. Chromosomal instability syndrome of total premature chromatid separation with mosaic variegated aneuploidy is defective in mitotic-spindle checkpoint. *Am J Hum Genet* 2000;67:483-486
- Mikkelsen M, Poulsen H and Nielsen G. Incidence, survival, and mortality in Down syndrome in Denmark. *Am. J. Med. Genet* 1990;7(suppl.):75-78
- Mikkelsen M, Hallberg A, Poulsen H, Frantzen M, Hansen J and Petersen MB. Epidemiological study of Down's syndrome in Denmark, including family studies of chromosomes and DNA markers. *Dev Brain Dysfunct* 1995;8:4-12
- Morris JK, De Vigan C, Mutton DE, Alberman E. Risk of a Down syndrome live birth in women 45 years of age and older. *Prenat Diagn* 2005 Apr; 25(4):275-8

- Mutton D, Alberman E, Hook EB. Cytogenetic and epidemiological findings in Down Syndrome, England and Wales 1989 to 1993. National Down Syndrome Cytogenetic Register and the Association of Clinical Cytogeneticists. J Med Genet 1996;33(5):387-394
- Nasmyth K. Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. Science 2002;297:559-565
- Nielsen J, Jacobsen P, Mikkelsen M, Niebuhr E and Sorensen K . Sex ratio in Down syndrome. Ann Genet 1981;24:212-215
- Park JP, Wurster-Hill DH, Andrews PA, Cooley WC, Graham JM. Free proximal trisomy 21 without the Down's Syndrome. Clin Genet 1987;32:342-348
- Pelz J. & Sperling K. Trisomy 21 case-control surveillance: concept and evidence for preconceptual X-irradiation as a potential risk factor. In: M. Macek Sr, D. W. Bianchi, H. Cuckle, eds. Early prenatal diagnosis, fetal cells and DNA in the mother - present state and perspectives. 12th Fetal Workshop Charles University in Prague. The Karolinum Press Prague, May 2001:398-408, 2002
- Petersen MB, Antonarakis SE, Hassold TJ, Freeman SB, Sherman SL, Avramopoulos D and Mikkelsen M. Paternal Non-disjunction in trisomy 21: an excess of male patients. Hum. Mol. Genet 1993; 2:1691-1695
- Peterson MB, Mikkelsen M. Nondisjunction in trisomy 21: origin and mechanisms. Cytogenet Cell Genet 2000;91:199-203
- Rex AP, Preuss M. A diagnostic index for Down Syndrome. J Pediatr 1982;100(6):903-906
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988 Jan 29;239(4839):487-91.
- Savage AR, Petersen MB, Pettay D, Taft L, Allran K, Freeman SB, Karadima G, Avramopoulos D, Torfs C, Mikkelsen M, Hassold TJ, Sherman SL. Elucidating the mechanisms of paternal Non-disjunction of chromosome 21 in humans. Hum Mol Genet 1998 Aug; 7(8):1221-7

- Sherman S. Correction of the evaluation of recombination in meiosis I and II nondisjunction in trisomy 21. *Am J Hum Genet* 1992 May; 50(5):1137-8
- Sperling K. Has low dose irradiation an effect on chromosomal Non-disjunction in man? In: Singh JR, Sperling K, Neitzel H, eds. *Progress in Human genetics*. Amritsar Printwell 1998:263-273
- Sperling K. et al. Monitoring of chromosomal anomalies in Berlin (West) between 1980 und 1988. In: Macek M, Ferguson-Smith MA, Spala M, eds. *Early fetal diagnosis: recent progress and public health implication*. Prague 1992:57-65
- Sperling K, Pelz J, Wegner R-D, Schulzke I, Struck E. Frequency of trisomy 21 in Germany before and after the Chernobyl accident. *Biomed Pharmacother* 1991;45:255-262
- Sperling K, Pelz J, Wegner R-D, Dörries A, Mikkelsen M. A significant increase of trisomy 21 in Berlin nine month after the Chernobyl accident: temporal correlation or causal relation? *Br Med J* (1994 a) 309:158-162
- Sperling K, Pelz J, Wegner R-D, Dörries A, Mikkelsen M. Bewertung eines Trisomie 21 Clusters im Jahr 1987 in Berlin, neun Monate nach dem Reaktorunfall von Tschernobyl, anhand der Bradford Hill Kriterien. *Med Genetik*(1994 b) 6:378-385
- Stene J, Stengel-Rutkowski S. Genetic risks for familial reciprocal translocations with special emphasis on those leading to 9p, 10p and 12p trisomies. *Ann Hum Genet* 1982 Jan 1; 46(Pt 1):41-74
- Stuppia L, Gatta V, Gaspari AR, Antonucci I, Morizio E, Calabrese G, Palka G. C677T mutation in the 5,10-MTHFR gene and risk of Down syndrome in Italy. *Eur J Hum Genet* 2002 Jun;10(6):388-90
- Waardenburg PJ. In: *Das Menschliche Auge und seine Erbanlagen*. Bd. VII Gravenhage, Martinus Nijhoff's 1932:47
- Williams JD, Summit RL, Martens PR, Kimbrell RA. Familial Down syndrome du to T(10;21) translokation: evidence that the Down phenotype is related to trisomy of a specific segment of chromosome 21. *Am J Hum Genet* 1975;27:478-485

Williams CA, Frias JL, McCormick MK, Antonorakis SE. Clinical, cytogenetic, and molecular evaluation of a patient with partial trisomy 21(21q11-q22) lacking the classical Down syndrome phenotype. *Am J Med Genet Suppl.* 1990;7:110-114

Yanamandra K, Bocchini JA Jr, Thurmon TF. Absence of association of fetal MTHFR C677T polymorphism with prenatal Down syndrome pregnancies. *Eur J Hum Genet* 2003 Jan; 11(1):5

Yoon PW, Freeman SB, Sherman SL, Taft LF, Gu Y, Pettay D, Flanders WD, Khoury MJ, Hassold TJ. Advanced maternal age and the risk of Down syndrome characterized by the meiotic stage of chromosomal error: a population-based study. *Am J Hum Genet* 1996 Mar; 58(3):628-33

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonucleinsäure (-acid)
dNTP	beliebiges 2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat Dinatriumsalz
M I	Meiose 1
M II	Meiose 2
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
p-Arm	Kurzer Arm des Chromosoms
q-Arm	Langer Arm des Chromosoms

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABB. 1: KIND MIT DOWN SYNDROM.....	-12-
ABB. 2: DER C-T-BASENAUSTAUSCH AM NUCLEOTID 677 (677C-T) MUTATION IM METHYLENTETRAHYDROFOLAT-REDUKTASE (MTHFR) GEN	- 17 -
ABB. 3: KARTE DES OMANS; RECHTS SIND DIE ANZAHL UND REGIONEN DER FAMILIEN, DIE AUFGESUCHT WURDEN, VERZEICHNET.	- 23 -
ABB. 4: DNA-EXTRAKTION	-26-
ABB. 5 EICHKURVE DES GENESCAN-400HD SIZE STANDARD	- 32 -
ABB. 6: BEISPIELAUSWERTUNG EINES KINDES MIT TRISOMIE 21	-33-
ABB. 7: ALTERSVERTEILUNG DER MÜTTER	- 39 -
ABB. 8: ALTERSVERTEILUNG DER VÄTER.....	- 40 -
ABB. 9: HERKUNFTSLÄNDER DER ELTERN	- 40 -
ABB. 10: KONSANGUINITÄT IN DER GESAMTSTUDIE	- 41 -
ABB. 11: GESCHLECHTERVERHÄLTNISSE SIND IN DER GESAMT UND TEILSTUDIE BEI DOWN SYNDROM KINDERN DEUTLICH ZUGUNSTEN DER JUNGEN VERTEILT	- 41 -
ABB. 12: ERGEBNISSE DER MOLEKULARGENETISCHEN ANALYSE ZUR PATERNALITÄT UND ZUM NON- DISJUNCTION IN M I UND M II.....	- 42 -
ABB. 13: CROSSING-OVER HÄUFIGKEITEN PRO INTERVALLABSCHNITT.....	- 43 -
ABB. 14: CROSSING-OVER HÄUFIGKEITEN IN DREI MATERNALEN ALTERSGRUPPEN, IN DENEN EINE FEHLVERTEILUNG DER MEIOSE 1 AUFTRAT.	- 43 -
ABB. 15: CROSSING-OVER HÄUFIGKEITEN IN DREI MATERNALEN ALTERSGRUPPEN, IN DENEN EINE FEHLVERTEILUNG DER MEIOSE 2 AUFTRAT.	- 44 -
ABB. 16: STAMMBAUM DER FAMILIE MIT 10 BETROFFENEN KINDERN; DIE MARKIERTEN PERSONEN WURDEN UNTERSUCHT.....	- 45 -
ABB. 17: FOTOS DER BETROFFENEN KINDER AUS DER UNTERSUCHTEN TEILFAMILIE	- 46 -
ABB. 18: KARYOGRAMM EINER TRANSLOKATIONS-TRISOMIE EINES BETROFFENEN SOHNES	- 47 -
ABB. 19: ERGEBNISSE DER FAMILIE MIT 10 BETROFFENEN KINDERN.....	- 49 -
ABB. 20: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER INTERVALLEINTEILUNG DES CHROMOSOMS 21	-62-
ABB. 21: KRIEGE UND BEWAFFNETE KONFLIKTE IM VORDEREN UND MITTLEREN ORIENT.....	- 49 -

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. Karl Sperling und Frau Professor Dr. Heidemarie Neitzel, den gemeinsamen Projektleitern, danke ich für die sehr gute Betreuung und Überlassung des Themas. Ihre Begeisterung für Genetik war überaus ansteckend.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Heidemarie Neitzel, die mit großem Engagement die Studie vorbereitete, zwei Forschungsaufenthalte im Oman zur Sammlung hunderter Proben persönlich durchführte, dabei ungezählte Kilometer mit dem Jeep zurücklegte und sogar all die Stapel von Fragebögen in Ihrem Handgepäck mitbrachte. Während der gesamten Zeit betreute sie mich freundlich und engagiert, brachte mir wissenschaftliches Arbeiten bei und hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen und viele wertvolle Ratschläge.

Frau Dr. Anna Rajab, der einzigen Person, die im Oman für die klinisch-genetische Diagnostik und die zytogenetische Diagnostik zuständig ist, danke ich für die Vorbereitung der Forschungsaufenthalte und Durchführung vieler Parallelarbeiten vom Oman aus. Sie übernahm unter anderem die Kontaktaufnahme zu den Familien und Ihren betreuenden Ärzten vor Ort und überzeugte sie, an dieser Studie teilzunehmen. Sie und ihre Mitarbeiter tragen zu einem großen Anteil am Erfolg dieses Projekts bei.

Für die Einarbeitung in die Labormethoden und Betreuung verdanke ich Herrn Dipl.-Ing Mohsen Karbasiyan sehr viel. Mit viel Sachverstand, Freundlichkeit und noch mehr Geduld löste er als mein ständiger Ansprechpartner mit mir jedes technische und methodische Problem.

Herrn Karim Marnich danke ich für die Anfertigung von Fotos und Videomaterial.

Allen Patienten und Angehörigen danke ich für ihre Geduld und Kooperativität, Sie trugen im entscheidenden Maße zum Gelingen dieser Arbeit bei, und machten unsere Forschungsarbeiten erst möglich.



إلى جميع المراضاء مع عوائلهم لهم الشكر الجزيل لمسأعتي في تقديم

الأطروحة و البحوث العلمية للخطول على الدكتوراه

ERKLÄRUNG AN EIDES STATT

Hiermit erkläre ich, Jenny Nätke, geboren am 25.06.1979 an Eides Statt,
dass die Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde,
auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und unter Nutzung der im
Literaturverzeichnis angegebenen Quellen entstand.

Berlin, den 13.09.2005

Jenny Nätke